

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA
DE EXTRACTOS DE PLANTAS DEL NORESTE DE MÉXICO

Por

Q.C.B. LILIANA TORRES GONZÁLEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Química Biomédica

Agosto de 2007

Aprobación de Tesis:

Dra. Paula Cordero Pérez

Directora de Tesis

Dra. Noemí Waksman de Torres

Co-Director de Tesis

Dr. Ricardo Salazar Aranda

Co-Director de Tesis

Dr. Dionicio A. Galarza Delgado

Subdirector de Estudios de Posgrado

Presentado por:

Q.C.B. LILIANA TORRES GONZÁLEZ

El presente trabajo se realizó en los Departamentos de Bioquímica y Química Analítica, de la Facultad de Medicina, así como en la Unidad de Hígado del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Paula Cordero Pérez y la co-dirección de la Dra. Noemí Waksman de Torres y del Dr. Ricardo Salazar Aranda.

Dra. Paula Cordero Pérez

Director de Tesis

Dedicatoria

Dedico esta tesis con alegría y gratitud

A mi Familia

Israel Torres González,
María Guadalupe González Infante,
Rafael Torres Villar

Y

Amigos

Agradecimientos

Doy gracias a Dios por su misericordia y amor para conmigo, pues me ha permitido desarrollarme profesionalmente y crecer personalmente durante este tiempo.

A mi hermano Israel Torres González por su paciencia, apoyo y amor durante estos años.

A mis compañeros y amigos de la Unidad de Hígado: Amanda, Bricehidy, Miguel, Chen, Alnitak, Magda, Marcelo, Karina, por su apoyo durante el desarrollo de la tesis, quienes contribuyeron de una manera inmedible, e hicieron mucho mas placentero este tiempo.

A mis compañeros y amigos de Bioquímica Clara, Daniel, Karina, Lourdes, Olivia, Owen, Cristian, Diana, muchas gracias por su apoyo durante todo este tiempo y compañía durante el desarrollo de los experimentos, fue un placer haber trabajado con ustedes.

A mis compañeros y amigos de Química Analítica Anabel, Ricardo, David, Ericka, Brenda, Adolfo, Idalia, gracias por su compañía y su apoyo durante los experimentos, a Maribel, Verónica, Gloria, Martha, Agustín, Cuathemoc y otros integrantes por las facilidades proporcionadas, a Ivonne por estar

siempre con disposición para lo que necesitara, al Dr. Alejandro por sus muy valiosos consejos, a la Dra. Verónica Rivas por su disposición para ayudar.

A mis amigos Myrna, Armando, Rocío, a las Familias Salazar, Gallardo, Ayala y Castellanos que fueron un importante soporte durante el tiempo de desarrollo de la tesis.

Al Dr. Ricardo Salazar Aranda gracias por formar parte de la comisión de tesis, por sus valiosas sugerencias durante el desarrollo del presente trabajo y por sus aportaciones objetivas.

A la Dra. Noemí Waskman de Torres, por sus sugerencias e interés en el presente trabajo, por la disposición de su tiempo para revisión y por el apoyo brindado en todo lo que involucró el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Ana María Rivas Estilla por sus consejos durante este tiempo, por permitirme el uso del área que a su cargo dirige y su invaluable ayuda en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Paula Cordero Pérez mi agradecimiento mas sincero por todo, por sus enseñanzas desde el punto de vista profesional y personal, por su tiempo invertido en la revisión del trabajo, por tener siempre disposición para revisar dudas, le doy muchas gracias a Dios por su vida. Gracias por haberme permitido ser su estudiante y haber aprendido mucho de ella.

Al Biólogo Botánico Humberto Sánchez, por habernos acompañado en las colectas y apoyarnos en la identificación de las plantas para su recolección.

A la Dra. Linda Elsa Muñoz Espinosa por haberme permitido estudiar durante este tiempo y participar en mi formación profesional.

Al CONACYT por la beca de manutención con registro 189166 otorgada para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias con especialidad en Química Biomédica.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo del proyecto “Estudio de metabolitos aislados de plantas del noreste de México con actividad hepatoprotectora” PROMEP/103.5/04/757 y PAICYT SA992-04.

RESUMEN

Q.C.B. Liliana Torres González.

Universidad Autónoma de Nuevo León.

Facultad de Medicina.

Título del estudio: Evaluación *in vitro* de la actividad hepatoprotectora de extractos de plantas del Noreste de México.

Número de páginas:

Área de estudio: Química Biomédica.

Propósito y Método de estudio: Evaluar la actividad antioxidante y hepatoprotectora de extractos de plantas del noreste de México a través de un modelo *in vitro*. Búsqueda bibliográfica, selección y recolección de cuatro plantas, obtención de extractos hidroalcohólicos, determinación de la actividad antioxidante de los extractos (a través de la prueba de DPPH) y en células Huh7 (a través de las pruebas de glutatión reducido y malondialdehído), evaluación del efecto de extractos sobre las células Huh7 (medición de aspartato aminotransferasa y % de viabilidad), evaluación de la hepatoprotección tras la inducción de daño por CCl₄ medida por AST, GSH y MDA. Selección del extracto con mayor actividad hepatoprotectora y realización de subfracciones. Evaluación de la actividad antioxidante de las subfracciones sobre Huh7 y del efecto hepatoprotector de las mismas.

Contribuciones y Conclusiones:

Todas las plantas presentaron actividad antioxidante por DPPH, variando de acuerdo a la parte de la planta utilizada, un millón de células de la línea Huh7 fue la requerida para poder evaluar la actividad hepatoprotectora de los extractos de interés, el extracto hidroalcohólico de flor de *Centaurea americana* fue el único que no mostró efecto tóxico sobre la línea celular Huh7 a las dosis de estudio a través de los ensayos realizados y mostró actividad hepatoprotectora a todas las concentraciones en la línea celular Huh7 retada con CCl₄, la subfracción de acetato de etilo de la flor de *C. americana* no mostró efecto tóxico sobre Huh7 y presentó una actividad hepatoprotectora a dosis de 100 y 1000 µg/mL.

Dra. Paula Cordero Pérez

Director de Tesis

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 El hígado y su importancia.....	
1.1.1 Morfología microscópica y fisiología hepática.....	
1.1.2 Etiología de las enfermedades hepáticas.....	
1.2.3 Perspectiva global de las enfermedades hepáticas.....	
1.1.4 Tratamiento de las hepatopatías.....	
1.2 Medicina alternativa y complementaria.....	
1.2.1 Productos herbales en el tratamiento de las enfermedades hepáticas.....	
1.2.1.1 <i>Silybum marianum</i> (silimarina).....	
1.3 Modelos para la evaluación de extractos de plantas.....	
1.4 Justificación.....	
1.5 Objetivo General.....	
1.6 Objetivos Específicos.....	

CAPÍTULO II. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1 Material.....	
2.1.1 Reactivos y Solventes.....	
2.1.2 Material herbario.....	
2.1.3 Material biológico.....	
2.1.4 Material general.....	
2.2 Equipo.....	
2.3 Métodos.....	
2.3.1 Búsqueda bibliográfica.....	

2.3.2 Obtención de extractos hidroalcohólicos.....	
3.3.3 Obtención de las subfracciones a partir del extracto hidroalcohólico seleccionado.....	
2.3.4 Medición de la actividad antioxidante de los extractos.....	
2.3.5 Cultivo celular.....	
2.3.5.1 Congelamiento de la línea parental de hepatoma humano Huh7.....	
2.3.5.2 Mantenimiento de la línea celular Huh7.....	
2.3.5.3 Plaqueo celular.....	
2.3.6 Medición de la viabilidad celular después de la exposición de la línea Huh7 al extracto hidroalcohólico.....	
2.3.7 Evaluación de la hepatoprotección por el extracto hidroalcohólico sobre Huh7.....	
2.3.7.1 Modelo de daño de inducción por CCl ₄	
2.3.7.2 Evaluación de la actividad hepatoprotectora de los extractos hidroalcohólicos.....	
2.3.7.3 Determinación de transaminasas.....	
2.3.7.3.1 Determinación de AST.....	
2.3.7.3.2 Determinación de ALT.....	
2.3.8 Medición de la peroxidación lipídica.....	
2.3.8.1 Procedimiento de análisis.....	
2.3.9 Determinación de glutatión.....	
2.3.9.1 Procedimiento de análisis.....	
2.3.10 Análisis estadístico.....	
CAPÍTULO III. RESULTADOS	
3.1 Plantas de la región noreste.....	
3.2 Clasificación taxonómica.....	

3.2.1	<i>Turnera diffusa</i>
3.2.2	<i>Centaurea americana</i>
3.2.3	<i>Juglans mollis</i>
3.2.4	<i>Krameria ramosissima</i>
3.3	Obtención de extractos hidroalcohólicos.....
3.4	Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos obtenidos.....
3.5	Evaluación de la actividad hepatoprotectora de los extractos hidroalcohólicos de las 4 plantas seleccionadas en la línea celular de hepatoma Huh7 expuesta a tetracloruro de carbono.....
3.5.1	Modelo de inducción de daño por CCl ₄
3.5.2	Efecto de los extractos hidroalcohólicos sobre Huh7 medido por la liberación de AST.....
3.5.3	Efecto de los extractos hidroalcohólicos sobre Huh7 medido por el porcentaje de viabilidad.....
3.5.4	Efecto de los extractos hidroalcohólicos sobre Huh7 en la producción de malondialdehído.....
3.5.5	Efecto de los extractos hidroalcohólicos sobre Huh7 en el consumo de glutatión reducido.....
3.5.6	Efecto hepatoprotector de los extractos hidroalcohólicos sobre Huh7 medido por la liberación de AST.....
3.5.7	Efecto hepatoprotector de los extractos hidroalcohólicos sobre Huh7 medido por la producción de malondialdehído.....
3.5.8	Efecto hepatoprotector de los extractos hidroalcohólicos sobre Huh7 medido por el consumo de glutatión reducido.....
3.6	Obtención de las subfracciones del extracto hidroalcohólico con mayor actividad hepatoprotectora utilizando solventes de diferente polaridad.....
3.7	Evaluación de la actividad antioxidante y hepatoprotectora de las subfracciones en la línea celular de hepatoma Huh7 expuesta a CCl ₄
3.7.1	Efecto de las subfracciones del extracto de flor de <i>Centaurea americana</i> sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en la evaluación de los niveles de AST.....
3.7.2	Efecto de las subfracciones del extracto de flor de <i>Centaurea americana</i> sobre la línea celular de hepatoma Huh7, evaluación de la viabilidad celular.....
3.7.3	Efecto de las subfracciones del extracto de flor de <i>Centaurea americana</i> sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en la producción de malondialdehído.....
3.7.4	Efecto de las subfracciones del extracto de flor de <i>Centaurea americana</i> sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en el consumo de glutatión reducido.....

3.7.5 Efecto hepatoprotector de las subfracciones del extracto de flor de <i>Centaurea americana</i> sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en los niveles de AST.....	
3.7.6 Efecto hepatoprotector de las subfracciones de flor de <i>Centaurea americana</i> sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en la producción de malondialdehído.....	
3.7.7 Efecto hepatoprotector de las subfracciones del extracto de flor de <i>Centaurea americana</i> sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en el consumo de glutatión reducido.....	

CAPITULO IV. DISCUSIÓN

CAPITULO V. CONCLUSIONES

CAPITULO VI. PERSPECTIVAS

CAPITULO VII. BIBLIOGRAFÍA

Lista de tablas.

Tabla 1. Estudios clínicos del tratamiento con silimarina en enfermedades hepáticas.....	21
Tabla 2. Cálculos para la realización de estándares de la curva de calibración de MDA.....	49
Tabla 3. Porcentajes de recuperación obtenidos para los extractos hidroalcohólicos.....	60

Tabla 4. Preparación de estándares para espectrofluorometría

Tabla 6. Preparación de estándares de GSSG

Tabla 8. Porcentaje de reducción obtenido de los extractos hidroalcohólicos de las plantas evaluadas

Tabla 9. Resultados de AST y ALT a las dosis evaluadas y tiempos de exposición.

Tabla 10. Porcentaje de recuperación obtenido para las diferentes subfracciones

Lista de figuras.

- Figura 1. Representación de la ubicación anatómica del hígado
- Figura 2. Fotografía de la línea celular Huh-7 parental en medio D-MEM suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico
- Figura 3. Metodología realizada para la obtención de los extractos hidroalcohólicos
- Figura 4. Metodología realizada para la obtención de las subfracciones del extracto hidroalcohólico seleccionado
- Figura 5. Cámara de Neubauer
- Figura 6. Estructura molecular de MTT y su producto
- Figura 7. Esquema General de procedimiento de MTT
- Figura 8. Representación del mecanismo de acción del CCl_4
- Figura 9. Reciclaje de GSH
- Figura 10. Fotografía de *Turnera diffusa*
- Figura 11. Fotografía de *Centaurea americana*
- Figura 12. Fotografía de *Juglans mollis*
- Figura 13. Fotografía de *Krameria ramosissima*
- Figura 14. Niveles de AST y ALT (UI/L) después de la exposición de Huh7 a CCl_4 por 1 hora
- Figura 15. Niveles de AST y ALT (UI/L) después de la exposición de Huh7 a CCl_4 por 2 horas
- Figura 16. Niveles de AST y ALT (UI/L) después de la exposición de Huh7 a CCl_4 por 3 horas
- Figura 17. Efecto de los extractos hidroalcohólicos sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en los niveles de AST (UI/L)
- Figura 18. Efecto de los extractos hidroalcohólicos sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en la viabilidad celular (%)
- Figura 19. Efecto de los extractos hidroalcohólicos sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en la producción de MDA(nmol/L)
- Figura 20. Efecto de los extractos hidroalcohólicos sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en el consumo de GSH(μM)
- Figura 21. Efecto de los extractos hidroalcohólicos después de la exposición a CCl_4 40mM por 2 horas sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en los niveles de AST (UI/L)
- Figura 22. Efecto de los extractos hidroalcohólicos después de la exposición a CCl_4 40mM por 2 horas sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en la producción de MDA(nmol/mL)

- Figura 23. Efecto de los extractos hidroalcohólicos después de la exposición a CCl_4 40mM por 2 horas sobre la línea celular de hepatoma humano Huh7 en el consumo de GSH(μM)
- Figura 24. Efecto de las subfracciones del extracto de flor de *C. americana* sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en los niveles de AST (UI/L)
- Figura 25. Efecto de las subfracciones del extracto de flor de *C. americana* sobre la línea celular de hepatoma humano Huh7 en la viabilidad celular (%)
- Figura 26. Efecto de las subfracciones del extracto de flor de *C. americana* sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en la producción de MDA(nmol/mL)
- Figura 27. Efecto de las subfracciones del extracto de flor de *C. americana* sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en el consumo de GSH(μM)
- Figura 28. Efecto de las subfracciones del extracto de flor de *C. americana* después de la exposición a CCl_4 40mM por 2 horas sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en los niveles de AST (UI/L)
- Figura 29. Efecto de las subfracciones de flor de *C. americana* después de la exposición a CCl_4 40mM por 2 horas sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en la producción de MDA(nmol/mL)
- Figura 30. Efecto de las subfracciones del extracto de flor de *Centaurea americana* después de la exposición a CCl_4 40mM por 2 horas sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en el consumo de GSH (μM)

Abreviaturas y símbolos

ALT	Alanino amino transferasa
AST	Aspartato amino transferasa
A.C.	Antes de Cristo
GSH	Glutación reducido
TBARS	Especies reactivas de ácido tiobarbitúrico
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
cm ²	centímetros cuadrados
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
°C	Grados Celsius (o centígrados)
D.C.	Después de Cristo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	Radical 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IL-10	Interleucina 10
INF- γ	Interferón gamma
IL-4	Interleucina 4
Kg	Kilogramo
MAC	Medicina Alternativa y complementaria
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol –2-il)-2,5-difeniltetrazolium
mM	Milimolar
mg	Miligramos
PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos
RNA	Acido ribonucléico

rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal bovino
μL	Microlitros
UI/L	Unidades Internacionales por litro
μM	Micromolar
VHC	Virus de Hepatitis C
VHB	Virus de Hepatitis B
x	Veces la concentración
%	Porcentaje

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 El hígado y su importancia.

El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo. Pesa aproximadamente 1,300 Kg y esta situado por debajo de las costillas en la parte superior derecha del abdomen (Figura 1). El hígado se divide en 2 lóbulos cada uno constituido por cuatro segmentos. Cuenta con un importante suministro de oxígeno a través de la arteria hepática, además la vena porta proporciona nutrientes, compuestos endógenos y otras sustancias que son absorbidas desde el intestino (Méndez-Sánchez *et al.*, 2003).

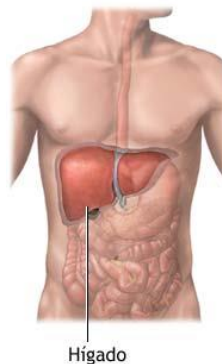


Figura 1. Representación de la ubicación anatómica del hígado.

1.1.1 Morfología microscópica y fisiología hepática.

El hígado lleva a cabo múltiples funciones esenciales, incluyendo la formación y excreción de bilis, síntesis de proteínas, detoxificación de xenobióticos y compuestos endógenos, así como regulación de la glucosa sanguínea. Un desorden en la homeostasia genera lesiones que son

traducidas en enfermedad (Castañeda *et al.*, 2007; Piñeiro *et al.*, 2004). El hígado esta constituido por cuatro principales tipos de células:

- ❶ Los hepatocitos que son la maquinaria biosintética del hígado.
- ❷ Las células endoteliales ubicadas en la línea sinusoidal que sirven como una barrera entre la sangre y los hepatocitos.
- ❸ Las células de Kupffer, las cuales funcionan como macrófagos.
- ❹ Las células estelares que almacenan grasa y vitamina A.

1.1.2 Etiología de las enfermedades hepáticas.

Las enfermedades hepáticas son causadas principalmente por medicamentos o drogas (particularmente consumo excesivo de alcohol), infecciones de origen viral (principalmente por virus de hepatitis B y C), acumulación excesiva de grasa y desordenes de tipo autoinmune (Lee *et al.*, 2003, Neuschwander *et al.*, 2003, Castañeda *et al.*, 2007, Méndez-Sánchez *et al.*, 2003). Estos agentes pueden inducir hepatitis, el cual es un estado inflamatorio de tipo agudo. Si este estado es persistente se produce entonces un proceso crónico reversible denominado fibrosis, la cual es una respuesta a la curación de heridas caracterizada por la acumulación de matriz extracelular que sigue a las formas crónicas de las enfermedades hepáticas (Muñoz, 1988; Muñoz *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 1986; <http://www.who.int>; <http://www.ssa.gob.mx>; <http://www.who.int>). El evento central de la fibrosis hepática, es la activación de las células estelares, conocidas también como lipocitos, células de Ito, células perisinusoidales o células almacenadoras de grasa. Estas células estelares provocan una serie de cambios incluyendo la degradación de los componentes de matriz

extracelular, contracción vascular y liberación de citocinas. La cirrosis es el estado siguiente al que puede evolucionar el hígado si no es resuelta la fibrosis. Sin embargo el estadio exacto en que la fibrosis/cirrosis se hace irreversible es desconocido (Muñoz *et al.*, 1994). La función principal de las células estelares es el almacén de la vitamina A y mantenimiento de los componentes de matriz normales, los cuales son: colágenos, glicoproteínas no colágenas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos y proteínas de matriz; al ocurrir una lesión hepática, las células estelares llevan a cabo una activación, en la cual existe pérdida de vitamina A y se transforma en una célula altamente proliferativa con síntesis de componentes de matriz ricos en colágena tipo 1 (Sherlok, 1989; Galambos *et al.*, 1983). Se ha demostrado que la activación de las células estelares en hígados dañados conduce a su proliferación y transformación en células ligadas a miofibroblastos (Grant *et al.*, 1988). Esto se acompaña por una disminución de los retinoides celulares y la síntesis de alfa actina de músculo estriado y grandes cantidades de los mayores componentes de la matriz extracelular, incluyendo colágena tipo I, III y IV; fibronectina; laminina y proteoglúcidos (Dajir *et al.*, 1978; Zhan *et al.*, 2000). La activación de las células estelares consta de dos fases: la primera es la iniciación, también llamada estado proinflamatorio, caracterizados por cambios en la expresión de genes, con estimulación parácrina de una serie de células incluyendo células de Kupffer, hepatocitos, plaquetas, leucocitos y células endoteliales que participan en la producción de fibronectina y la segunda fase es la activación de varias citocinas, una de las más importantes es el factor de crecimiento transformante beta que pasa de su forma latente a su forma activa (forma profibrogénica) (Sakaida *et al.*, 1998).

Estos procesos pueden culminar en carcinoma hepatocelular donde existe un crecimiento no controlado de las células así como pérdida de la función normal de las células que constituyen este órgano. En algunos casos la única alternativa de tratamiento, es el trasplante hepático (Bataller *et al.*, 2005, Kershenobich *et al.*, 2003).

1.1.3 Perspectiva global de las enfermedades hepáticas en el mundo.

La infección por virus de hepatitis C (VHC) es un problema importante de salud mundial. Se ha estimado que 170 millones de individuos están infectados alrededor del mundo (WHO, 2000), y la prevalencia va de 10 a 20% en países como Egipto (WHO, 1998). En Inglaterra aproximadamente 27,000 personas han sido diagnosticados con VHC. Sin embargo, muchos de ellos no desarrollan síntomas de evidencia clínica de hepatitis aguda en el momento de la infección y estudios de prevalencia sugieren que 0.4% de la población (200,000 personas) podrían ser infectados por VHC. En ausencia de una vacuna disponible, la incidencia va en aumento, por lo que se ha estimado que se presentan 3 millones de nuevas infecciones por año (WHO, 2000). La morbilidad y mortalidad de la enfermedad varían. Puede ocurrir en cualquier individuo entre 10 a 30 años a partir del inicio de la infección, muriendo los pacientes de carcinoma hepatocelular, falla hepática u otra condición extrahepática.

Entre el 15 al 30% de los pacientes infectados presentan recuperación espontánea, sin embargo del 70 al 85% presentan infección crónica. Los pacientes pueden evolucionar a fibrosis en un período promedio de 20 años y del 15 al 20% desarrollan cirrosis hepática, aunque pueden evolucionar en

un promedio de tiempo de 10 a 15 años a partir del diagnóstico a carcinoma hepatocelular (Di Bisceglie *et al.*, 2003). En Estados Unidos los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades reporta que en el 2002, 3.2 millones de personas presentaron infección crónica por este virus, estimando de 8,000 a 10,000 muertes por esta causa. La Secretaría de Salud de México reportó que las enfermedades hepáticas crónicas ocupan la 5ª causa de mortalidad. Al parecer la etiología viral más frecuente de las hepatopatías crónicas es la infección por el virus de hepatitis C (Muñoz *et al.*, 1986).

Méndez-Sánchez *et al.*, (2005), realizaron un análisis de estimación de la tendencia en la prevalencia de las enfermedades hepáticas del 2005 al 2050 en México. Este estudio se basó en el reporte por la Secretaría de Salud. La causa de mortalidad fue calculada por edad (\geq a 25 años) y clasificada por sexo de acuerdo al Consejo Nacional de Población. Las causas de muerte relacionadas a las enfermedades hepáticas fueron colectadas de acuerdo con la Clasificación Internacional de las Enfermedades en su 10ª revisión. Incluyéndose enfermedad hepática no alcohólica y cirrosis, enfermedad hepática por alcohol (EHA), carcinoma hepatocelular (CHC), hepatitis B y hepatitis C en la fase aguda y crónica. El análisis de la tendencia muestra que la causa de prevalencia más importante de enfermedad hepática en el hombre será la enfermedad hepática por alcohol (866,848 casos) y en la mujer será la cirrosis no alcohólica (291,159 casos), seguida de la enfermedad hepática por alcohol.

La cirrosis causa anualmente 150, 000 muertes alrededor del mundo y de estas del 38 al 50% son por alcohol. Aproximadamente el 7.4% de la

población de Estados Unidos abusa del consumo de alcohol; en Europa del 20 al 30% de la población consume el alcohol en exceso (Méndez-Sánchez *et al.*, 2005). El incremento en el consumo de alcohol *per capita* correlaciona directamente con el número de muertes por cirrosis alcohólica en la mayoría de los países occidentales y en Japón. En nuestro país entre 1950 y 1975 se registraron aumentos de 100 a 500 % del consumo *per capita* de alcohol en términos de alcohol puro (Galambos *et al.*, 1983; Grant *et al.*, 1988). La cirrosis es la tercer causa de muerte en adultos entre 45 y 60 años de edad, y el alcohol esta relacionado con más del 50% de estas muertes (Dajir *et al.*, 1978; Stewart *et al.*, 2003). El 55.7% de los enfermos con cirrosis hepática atendidos en un período de 28 años en el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán tenía como etiología el alcoholismo y en segundo lugar estaba la etiología viral, correspondiendo al 35.5% de los casos. En el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” el 80% de los pacientes con hepatopatía crónica se presentan con cirrosis hepática, e igualmente la etiología más común es el alcoholismo (Muñoz, 1988). Durante el año 2001 de las 159 pacientes atendidos por consultas de primera vez en la Unidad de Hígado del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” las causas de daño hepático y/o vías biliares en orden de frecuencia fueron: hepatopatía crónica o portador asintomático de VHB o VHC (25%) varias enfermedades hepáticas (17%), enfermedad hepática alcohólica (15%), enfermedad de hígado graso no alcohólica (11%), cirrosis criptogénica (10%), hepatitis aguda (9%), hepatitis autoinmune (5%), cirrosis biliar primaria (5%) y síndrome de Gilbert (3%) (Muñoz *et al.*, 2002).

Las hepatitis virales causadas por virus hepatotrópicos hasta ahora conocidos son las A, B, C, D y E. Los virus B, C y D representan las etiologías más frecuentes de las hepatopatías crónicas después de la alcohólica en la mayoría de los países occidentales y nuestro país no es la excepción. Dentro de los casos con hepatitis aguda atendidos en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, la etiología más frecuente es el virus A (40%), seguida por el virus B (28%) y los otros virus (24%) (Muñoz *et al.*, 1994)

En China la etiología más frecuente de la cirrosis hepática es la infección crónica por el virus B (Galambos *et al.*, 1983). La infección por el VHB afecta aproximadamente a 2 millones de personas en el mundo y 400 millones son portadores crónicos (Lee, 1997).

Después de décadas de la infección crónica, cerca del 30 al 40% de los portadores progresan a cirrosis y de estos alrededor de 1 a 5% desarrollan CHC anualmente (Coffin *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Lok A, 2000).

El CHC es la causa más frecuente de cáncer de hígado. Este es responsable de aproximadamente 1,000,000 de muertes anuales alrededor del mundo. Los factores etiológicos asociados al desarrollo de CHC son las infecciones virales persistentes (VHC y VHB), el contacto persistente con aflatoxinas y cirrosis hepática. Durante las pasadas tres décadas, la incidencia se ha incrementado substancialmente en Japón, Reino Unido y Francia. Se reporta que la incidencia de CHC en los Estados Unidos se ha incrementado de 1.4 por 100,000 habitantes durante el período de 1976 a 1980 a 2.4 por 100,000 habitantes durante el período de 1991 a 1995 (Seow *et al.*, 2001). De acuerdo al CDC en Estados Unidos del 15 al 36% de los

casos de CHC están asociados con infección por VHB. En algunos casos el trasplante es la única opción terapéutica favorable para pacientes con CHC (CDC, 2002).

1.1.4 Tratamiento de las enfermedades hepáticas.

El tratamiento varía de acuerdo a la etiología de origen, para VHC se basa en una combinación de interferón α pegilado (INF- α -2b 1.5 μ g/semana/Kg o INF- α -2a, 180 μ g/peso/Kg) y ribavirina (800 a 1200 mg/día) por 24 a 48 semanas (NIH Consensus, 2002; Seeff *et al.*, 2002), el interferón consensus y la amantadina están en estudio fase IV, la timosina y la viramidina en fase III, VX-950, NM-283, BILB 1941, Inhibidores IMPDH, SCH 503034 en fase II y el AB68 el cual es un anticuerpo monoclonal y PYN17 que es una droga de origen botánico en fase I (Ferenci *et al.*, 2006). Se ha reportado que la respuesta virológica sostenida con interferón pegilado alfa y rivabirina en pacientes con hepatitis C es de aproximadamente de 54 a 63% (Fried *et al.*, 2002). En el tratamiento de VHB han sido empleados el interferón pegilado, así como análogos de nucleósidos los cuales inhiben la replicación viral (lamivudina, adefovir y entecavir) y se encuentra en estudio el Tenofovir (Dean *et al.*, 2006). La respuesta virológica en pacientes con hepatitis B crónica con análogos de nucleósidos o interferón va de 18 a 30% (Conjeevaram *et al.*, 2003). Se han descrito un serie de sustancias con actividad hepatoprotectora como la IL-10, la S-adenosilmetionina (SAME), Adenosina, Lipohen, Rychal-su y el Emodin entre otros (Larrey *et al.*, 1995; Bone-Larson *et al.*, 2001; Ahmad *et al.*, 2002; Schuppan *et al.*, 1999; Ansorena *et al.*, 2002). Sin embargo dos de los mas utilizados son la

SAMe y el ácido ursodesoxicólico (UDCA). La SAMe es una molécula distribuida en todo el cuerpo y actúa como un grupo donador de metilos y activador enzimático en un número de reacciones bioquímicas. La metionina es metabolizada en el hígado donde es convertida a SAMe por la SAMe-sintetasa. La SAMe es un componente esencial de reacciones de transaminación y precursor de poliaminas y síntesis de glutatión en el hígado (Chang *et al.*, 2006; Mato *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2001). Por otro lado el UDCA es un ácido biliar hidrofílico que disminuye los niveles de ácidos biliares hidrofóbicos endógenos e incrementa la proporción de ácidos biliares hidrofílicos no tóxicos. El UDCA incrementa la actividad de la metionina adenosil- transferasa y los niveles de glutatión hepático, el cual es una sustancia de defensa en control del daño celular oxidativo (Bellentani *et al.*, 2005; Angulo, 2002).

Los esfuerzos hasta ahora empleados para controlar las principales etiologías que afectan al hígado han sido enfocados hacia la concientización del uso de bebidas alcohólicas para prevenir la cirrosis alcohólica y la aplicación de vacunas para prevenir las hepatitis virales (niños y adultos vs hepatitis A y B), así como investigación en la población crónicamente enferma y el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos (interferón, interferón pegilado, análogos de nucleósido, modificadores de la respuesta inmune – interleucinas-, lamivudina, timosina alfa, etc). El aumento en las expectativas de vida con los tratamientos hasta ahora evaluados no ha obtenido resultados satisfactorios, por lo que el estudio de nuevas drogas efectivas en el tratamiento de las enfermedades hepáticas principalmente de origen por consumo de alcohol y hepatitis virales contribuirá

considerablemente en la resolución de este problema en nuestro país y a nivel mundial.

1.2 Medicina alternativa y complementaria.

La medicina alternativa y complementaria (MAC) es definida como “sistemas de diagnóstico y tratamiento médico diferido en técnica de los practicantes alopáticos usando drogas y cirugías para el tratamiento de enfermedades y heridas” (Carrie *et al.*, 2002) así mismo, se define MAC como “conjunto de sistemas, prácticas, productos médicos de atención de la salud, que no son integradas en la medicina convencional” por el Centro Nacional para la Medicina Alternativa y Complementaria (NCCAM por sus siglas en inglés National Center for Complementary and Alternative Medicine) creado en 1998 (Seeff *et al.*, 2001; Sparreboom *et al.*, 2004; Montes de Oca *et al.*, 2005; Comar *et al.* 2005). Las prácticas de atención de la salud son clasificadas en cinco categorías (Cohen M.H. *et.al.*, 2003):

- ❶ Sistemas de medicina alternativa (Homeopatía, Naturopatia, Medicina Tradicional China y Ayurvedica).
- ❷ Intervenciones de mente-cuerpo (meditación, oración, mente sana, arte, música o terapia de danza).
- ❸ Terapia basada en biología (hierbas, alimentos y vitaminas).
- ❹ Métodos basados en manipulación de cuerpo (quiropática o manipulación osteopática).
- ❺ Terapias de energía (Gi gong, Reiki, terapias de bioelectromagnetismo, en campos electromagnéticos).

La agencia para la investigación y calidad de cuidados de la salud dedica parte del programa "Práctica basada en evidencias" para reportes en MAC. En el 2004, 19 de más de 100 evidencias reportan intervenciones de MAC, en estos reportes se incluyen el empleo de suplementos botánicos y herbales, medicina tradicional y vitaminas (Shekelle *et al.*, 2005).

El termino MAC empleado para un grupo heterogéneo de teorías y prácticas ha tenido un incremento de uso por la población alrededor del mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha señalado que 80% de las personas que vive en los países en desarrollo utiliza la medicina tradicional herbolaria para resolver sus problemas de salud, con estos datos se puede calcular que 64% de la población mundial hace uso de las plantas medicinales en forma no industrializada, estimándose que el número de especies utilizadas varía entre 35,000 y 75,000 (Farnsworth *et al.*, 1991; Romero *et al.*, 2004). Esta organización mundial refiere que el uso de remedios herbales impulsó un mercado que se estimó en el 2003 alrededor de 60 billones de dólares anuales y sigue creciendo de forma constante (WHO, 2003). En el Reino Unido un 20% de la población utiliza MAC y en Alemania un 65% (Fogden *et al.*, 2003).

Se ha reportado que a la fecha al menos 42% de población de Estados Unidos usa MAC de forma regular (Carrie *et al.*, 2002). En el año 2001, 17.8 billones de dólares fueron invertidos por la población de los Estados Unidos en suplementos y 4.2 billones en hierbas y otros remedios herbales (Marcus *et al.*, 2002). En un estudio realizado en los Estados Unidos se demostró que el 39% de los pacientes atendidos en las clínicas hospitalarias usaban MAC y el 21% usaba preparaciones herbales principalmente para

indicaciones de desórdenes hepáticos, el remedio herbal más utilizado fue la silimarina. Se reportó también que del 20 a 30% de pacientes atendidos en Clínicas de Hígado utilizan remedios herbales (Seeff *et al.*, 2001; Fogden *et al.*, 2003). Se ha reportado el uso de la silimarina por el 31% de los pacientes atendidos en la Clínica de Hepatología en Oregon (Flora *et al.*, 1998). Otro estudio en el que se incluyeron 92 pacientes con VHC, se reporta que 61% de los pacientes refieren el uso de MAC, dentro del cual el 42% refirió el uso de vitaminas, 17% de minerales, 41% de remedios herbales y 18% de otros. La silimarina fue consumida por el 17% de los pacientes encuestados (Mayer *et al.*, 2005).

México no es la excepción a este hecho, el gobierno de la República Mexicana creó en los 70's el Instituto Mexicano Para el Estudio de las Plantas Medicinales (Impelam) como respuesta al problema de salud en zonas marginales. El Impelam intentaba, además de investigaciones a fondo, preservar conocimientos médicos milenarios por medio de la educación (Soto, 2003). Este esfuerzo se tradujo en el programa IMSS-Complamar en el cual se realizó un estudio con el propósito de difundir el conocimiento y las experiencias de los terapeutas tradicionales. En este estudio se informó que en promedio la proporción entre médicos convencionales y médicos que utilizan MAC en el medio rural era de 1 a 4, además se identificaron 1,950 especies de plantas utilizadas por médicos tradicionales a lo largo del país, la mayoría de las cuales fueron recolectadas de poblaciones silvestres con algún grado de cultivo y domesticación de las plantas más comunes (Lozoya, 1988).

Se ha estimado que solo el 1% de las plantas medicinales han sido estudiadas científicamente (Argueta, 1994). Se calcula que la flora medicinal mexicana contiene entre 3,000 y 5,000 plantas que tienen un potencial terapéutico, dato estimado por el Instituto Nacional Indigenista en 1997 (Gutiérrez *et al.*, 2006). En 1987, un estudio realizado por el IMSS referente al uso de la medicina tradicional, mostró que en el Estado de Sonora se utilizaban 102 plantas con propósitos medicinales. En este estudio se encontró que el 78% de las plantas medicinales eran utilizadas como tratamiento para enfermedades respiratorias y digestivas (Osuna *et al.*, 1989). En otro estudio realizado por el IMSS de Octubre 2000 a Febrero de 2001 que incluyó 106 médicos y 400 pacientes en hospitales de Morelos y el Hospital General de Cuernavaca mostró que el grado de aceptación de los fitofármacos entre los médicos fue de 68.8% y entre los pacientes 44.5%. El fitofármaco prescrito con mayor frecuencia fue el *Psyllium plantago*, le siguieron el extracto de *Valeriana officinalis*, *Aesculus hippocastanum* y *Ginkgo biloba* (Romero *et al.*, 2004). En el IMSS la División de Investigación Biomédica lleva el herbario medicinal del Seguro Social (Montes de Oca-Rosas D., y *et al.* 2005). Sin embargo, no hay estadísticas recientes en México sobre el porcentaje de personas que utilizan o dependen de la medicina tradicional, como tampoco lo hay sobre los volúmenes de comercio de las plantas medicinales más utilizadas.

Los problemas originados a partir de la utilización de productos herbales o plantas medicinales para el tratamiento de las enfermedades que atañen a la población son:

- La hepatotoxicidad producida tras el empleo de estos productos solos o en combinación con medicamentos convencionales o al obtener la planta equivocada a falta de un experto en el área, pues existen plantas con similares características físicas pero con metabolitos secundarios de distinta índole (Dominique *et al.*, 1995; Dominique *et al.*, 1997; Stedman *et al.*, 2002; McRae *et al.*, 2002).
- La falta de regulación en el control de calidad de los productos herbales o suplementos alimenticios, los cuales pueden presentar adulteración y consecuencia de esto son dosis inadecuadas de tratamiento lo cual modifica la farmacocinética (Marcus *et al.*, 2002; De Smet, 2002; Stickel *et al.*, 2005).

1.2.1 Productos herbales en el tratamiento de las enfermedades hepáticas.

Diversos estudios han descrito que agentes terapéuticos de plantas pueden poseer actividad anti-hepatitis o pueden actuar contra enfermedades asociadas al hígado. Una gran cantidad de especies vegetales a nivel mundial han sido empleadas con este fin, tales como: *Phyllanthus amarus*, *Picrorhiza kurroa*, *Glycyrrhiza glabra*, *Wilkstroemia indica*, *Silybum marianum*, *Peumus boldus* , *Taraxacum officinale*, *Anthemis nobilis*, *Centaureum erythraea*, *Centaurea aspera*, *Fumaria officinalis*, *Cynara scolymus*, *Bupléurum root*, *Pinellia tuber*, *Stephania tetrandra*, *Magnolia officinalis*, *Medicago sativa*, *Pimpinella anisum*, *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis*, *Nigella sativa*, *Trichilia rocka*, *Psoralea corylifolia*, *Ilex paraguariensis*, *Eclipta prostrata*, *Osbeckia aspera* entre otras. En la

literatura se ha reportado el beneficio de algunos de estos extractos ya que tienen moléculas con propiedades antioxidantes, antifibróticas, antivirales o anticarcinogénicas, tales como: glicirrizina, la filantina, silibinina, picrosida las cuales derivan de *Glycyrrhiza glabra*, *Phyllanthus amarus*, *Silybum marianum*, *Picrorhiza kurroa* respectivamente. Estas moléculas pueden servir como compuestos primarios para el desarrollo de drogas hepatotrópicas específicas (Schuppan et al., 1999; Ansorena et al., 2002; Hernández et al., 2001; Tsai S.M., et al., 2001; Angulo, 2002; Hamburger et al., 1991; Lozoya, 1997; Larrey et al., 1997).

Cabe mencionar que tanto la medicina tradicional China, Japonesa y Ayurvedica han descrito diversas formulaciones de extractos de plantas para el tratamiento de enfermedades hepáticas (Schuppan et al., 1999; McCulloch et al., 2002; Yamashiki et al., 1997).

1.2.1.1 *Silybum marianum* (silimarina).

Este extracto es uno de los productos herbales más utilizados por la población alrededor del mundo, en el 2001 este producto ocupó el lugar número 12 de los 20 productos más utilizados en el mercado de los Estados Unidos y su empleo tiene una extensa historia (Ball et al., 2005). Theophrastus en 371-287 A.C., filósofo griego y sucesor de Aristóteles lo refiere con el nombre de Pternix (Morazzoni et al., 1995). En tiempo de los romanos, Dioskurides (40-90 D.C.) describe la planta y que ésta era excelente para excretar bilis (Luper S., 1998). Para el siglo XVI, el *Silybum marianum* había comenzado a ser una planta medicinal para el tratamiento de las enfermedades hepatobiliares (Schuppan, 1999). En 1652, Nicolás

Culpeper, escribe “El médico Inglés” en el cual describe al *Silybum marianum* como una excelente planta para el tratamiento de obstrucciones de vesícula y en hígado (Ball, 2005). La planta llega a América con los colonizadores Europeos. A finales del siglo pasado los Eclécticos (1900), utilizaban extractos de esta planta para el tratamiento de hígado, vesícula, riñón y para desórdenes menstruales (Giese, 2001). El interés médico por el extracto se observó en 1960 cuando se realizaron investigaciones principalmente en Alemania, para el tratamiento de las enfermedades hepáticas agudas y crónicas que reportaron al extracto como un agente hepatoprotector para prevenir el daño por toxicidad (Luper, 1998).

Silybum marianum es una hierba que pertenece a la familia Asteraceae. Es nativa del área del Mediterráneo y crece en el sureste de Europa. A partir de las semillas de *Silybum marianum* se extrae la silimarina que es una mezcla de flavanolignanos: silibinina (principal componente activo), silidianina y silicristina (Morazzoni *et al.* 1995). Otros componentes incluyen la tiramina, histamina, aceites esenciales, lípidos, azúcares, alcaloides, saponinas, mucílagos, ácidos orgánicos, vitamina C, E y K y otros flavonoides tales como la quercetina, taxofolina y el dihidrokaempferol (Flora *et al.*, 1998). Además las semillas de esta planta contienen betaína (precursor de la S-adenosilmetionina una potencial sustancia hepatoprotectora) y ácidos grasos esenciales los cuales han mostrado tener una actividad anti-inflamatoria (Lupe, 1998).

Las preparaciones de esta planta son realizadas de varias formas. Dado que no es soluble en agua, el té (decocción) es considerado una forma ineficiente. Muchas preparaciones de la planta son extractos, ahora

estandarizados a 70 a 80% de silibinina. La baja absorción en el tracto gastrointestinal (23 a 47%) llevó a la necesidad de desarrollar formas con constituyentes como la fosfatidilcolina o beta ciclodextrina para mejorar su absorción (Simanek *et al.*, 2000).

La silimarina es administrada en cápsulas o tabletas de extracto estandarizado a 70 a 80% de silibinina, sin embargo la composición actual de la mayoría de las formulaciones es desconocida debido a su baja regulación por manufacturas o agencias gubernamentales (Boigk *et al.*, 1997). El tiempo de absorción de la concentración máxima en suero después de la administración oral depende del producto herbal administrado. Se recomienda 100 a 200 mg de silimarina dos a tres veces por día para el tratamiento de las enfermedades hepáticas (Blumenthal *et al.*, 2000).

Un estudio de biodisponibilidad mostró que una dosis oral simple de 560 mg de silimarina no complejada que equivale a 240 mg de silibinina, resultó en una concentración sérica máxima de 340 ng/mL, observada entre 1 y 3 horas posterior a la administración, dependiendo del producto utilizado. La silibinina es principalmente excretada en la bilis y secundariamente en la orina. La media de depuración en humanos es reportada de 6 a 7 horas (Lorenz *et al.*, 1984). La farmacocinética de la silibinina es modificada considerablemente cuando está complejada con otra molécula. Así el dihemisuccinato de silibinina es soluble en agua y la silibinina fosfatidilcolina soluble en lípidos, son fórmulas desarrolladas para incrementar su biodisponibilidad (Saller *et al.*, 2001).

Existen un número limitado de estudios clínicos controlados, randomizados, sobre investigación de la silimarina o la silibinina. Sin embargo, existen cerca

de 450 estudios científicos en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* respecto de la eficacia de este extracto (Ulrichova, 2000). Se han reportado varios mecanismos de acción para la silimarina de acuerdo a los resultados obtenidos de estas investigaciones, como antioxidante por incremento de la actividad de la enzima superóxido dismutasa en eritrocitos y linfocitos (Varga *et al.*, 2001), otro de ellos es que estabiliza la membrana de los hepatocitos, previniendo que las toxinas entren en la circulación enterohepática promoviendo la regeneración hepática por estimulación nucleolar de la polimerasa A e incremento de la síntesis de proteínas ribosomales (Blumenthal, 2000). La silibinina inhibe selectivamente la formación de leucotrieno B₄ por las células de Kupffer (DehmLow *et al.*, 1996); previene la depleción de glutatión en cultivo de hepatocitos humanos, protegiendo a las células del daño inducido por metotrexate y etanol (Neuman *et al.*, 1999). La silimarina tiene efectos inmunoestimuladores y aumenta la secreción de INF- γ , IL-4 e IL-10 en cultivo de linfocitos (Wilasrusmee *et al.*, 2002). Inhibe la producción de óxido nítrico en macrófagos (Kang *et al.*, 2002). La silibinina inhibe el crecimiento de células de hepatocitos (HepG2 y Hep3B) con una fuerte toxicidad en Hep3B, lo cual se asocia con la inducción de apoptosis. No se ha encontrado que la silimarina reduzca la carga viral en hepatitis (Chávez, 2001). La silimarina no ha mostrado tener actividad contra el virus de hepatitis B *in vitro* (Mehrotra *et al.* 1990). También redujo la progresión a fibrosis secundaria al consumo de alcohol en el modelo de primate africano (babuino) (Liebre *et al.*, 2003) y se ha reportado como extracto hepatoprotector atenuando una variedad de sustancias tóxicas, tales como, acetaminofén, etanol, tetracloruro de carbono y galactosamina (Chrungoo *et*

al., 1997). La silimarina puede ser eficaz en casos de hepatitis A, cirrosis por alcohol y en casos de exposición a químicos (Blumenthal, 2000).

En resumen la silimarina tiene varias propiedades benéficas con atractivo potencial terapéutico para las enfermedades hepáticas por alcohol, así como efectos en la regeneración hepática, en la peroxidación lipídica, en inflamación y en la fibrogénesis hepática.

1.3 Modelos para la evaluación de extractos de plantas.

Recientemente ha sido expuesta la importancia de la evaluación de los remedios herbolarios. Existen modelos *in vitro* e *in vivo* para dicho propósito. Referente a los sistemas *in vitro*, las líneas celulares de tumores humanos han sido extensamente utilizadas como modelos de varias enfermedades. Debido a que el hígado es el órgano central en el metabolismo de drogas y es el primer blanco de la patogénesis relacionada con drogas, el uso de las líneas celulares derivadas de hepatoma humano tales como HepG2, Huh-7, Hep3B, FOCUS y SK-Hep1 es relevante para evaluar el efecto hepatoprotector de extractos de plantas (Ljubuncic *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Kikkawa *et al.*, 2005; Keong *et al.*, 2001; Simanek *et al.*, 2000). Estas células se consideran transformadas y mantienen muchas funciones de las células hepáticas, además son menos susceptibles a apoptosis (Sprinzl *et al.*, 2001).

El empleo de este tipo de sistema presenta ventajas:

- Permite realizar múltiples experimentos en los cuales las variables pueden ser controladas, las dosis de estudio puede ser modificadas y

se pueden hacer varias réplicas de un experimento, siendo así reproducible.

- Las células tienen naturaleza metabólica similar al órgano de interés.
- Reduce significativamente el número de animales requeridos para una investigación.
- Provee efectivamente un rastreo de los compuestos de estudio.
- Permite investigar las vías de señalización y moleculares del mecanismo de acción del compuesto de interés.

También se cuenta con el cultivo primario de hepatocitos. Este provee un modelo para el estudio de los procesos fisiológicos y fisiopatológicos del hígado. Estas células son aisladas de especímenes frescos de hígado y se emplea el método de dos pasos de perfusión de colágena para la obtención de células, una vez obtenidas la suspensión homogénea del hígado es filtrada y purificada por triple centrifugación en hielo y se mide la viabilidad celular (determinada por exclusión de azul tripano). Una vez obtenidas las células se mantienen en condiciones de medio y humedad ideales (Schulze-Bergkamen H, *et al.* 2003).

Por otro lado está el modelo *in vivo*, en el cual se evalúan los efectos del compuesto de interés en un sistema celular más complejo, para este se pueden emplear ratas, babuinos, entre otros.

Como ha sido expuesto, la actividad hepatoprotectora de los extractos utilizados para el tratamiento de las enfermedades hepáticas se ha relacionado con sus propiedades antioxidantes. En la esteatohepatitis no alcohólica, en enfermedad hepática por virus C y en la enfermedad hepática

por alcohol, el estrés oxidativo producido por estos agentes genera especies reactivas de oxígeno (EROs) (Chang *et al.*, 2006; Neuschwander *et al.*, 2003; Jain *et al.*, 2002). Es bien conocido que EROs inician la peroxidación lipídica, modulan vías de señalización por efecto sobre las enzimas sensibles al estado óxido-reducción, organelos y factores de transcripción, afectando proteínas y ácidos nucleicos causando destrucción celular (Jaeschke *et al.*, 2000; Santra *et al.*, 2000; Lieber *et al.*, 1997; Otani *et al.*, 2005; Fernández-Checa *et al.*, 1998; Okuda *et al.*, 2002).

La capacidad antioxidante de los extractos puede ser determinada por el método captura del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) por espectrofotometría o por cromatografía en capa fina (Shanmugasundaram *et al.*, 2006), supresión de la oxidación de beta caroteno por espectrofotometría (Ljubuncic *et al.*, 2006), capacidad de captura del anión superóxido y radical hidroxilo (Russo *et al.*, 2005), con la medición de las especies reactivas de ácido tiobarbitúrico en homogeneizados de hígado de ratas (Ljubuncic *et al.*, 2005), inhibición de la actividad de xantina oxidasa (Russo *et al.*, 2005), por efecto en el glutatión celular (Knowles *et al.*, 1980), entre otros.

Para la inducción del daño celular se puede utilizar el tetracloruro de carbono (CCl_4), la D-galactosamina, el acetaminofén, entre otras drogas. Estos modelos experimentales de daño están bien establecidos en animales.

El CCl_4 se acumula en las células hepáticas y es metabolizado a radical triclorometil (CCl_3^*) por el sistema citocromo P-450 dependiente de monooxigenasas. El CCl_4 causa elevación de las transaminasas (aspartato aminotransferasa, AST y alanino aminotransferasa, ALT) en suero, así como

de malondialdehído por la inducción de la peroxidación lipídica y consumo del glutatión reducido en la célula para contrarrestar el efecto (Figura 2).

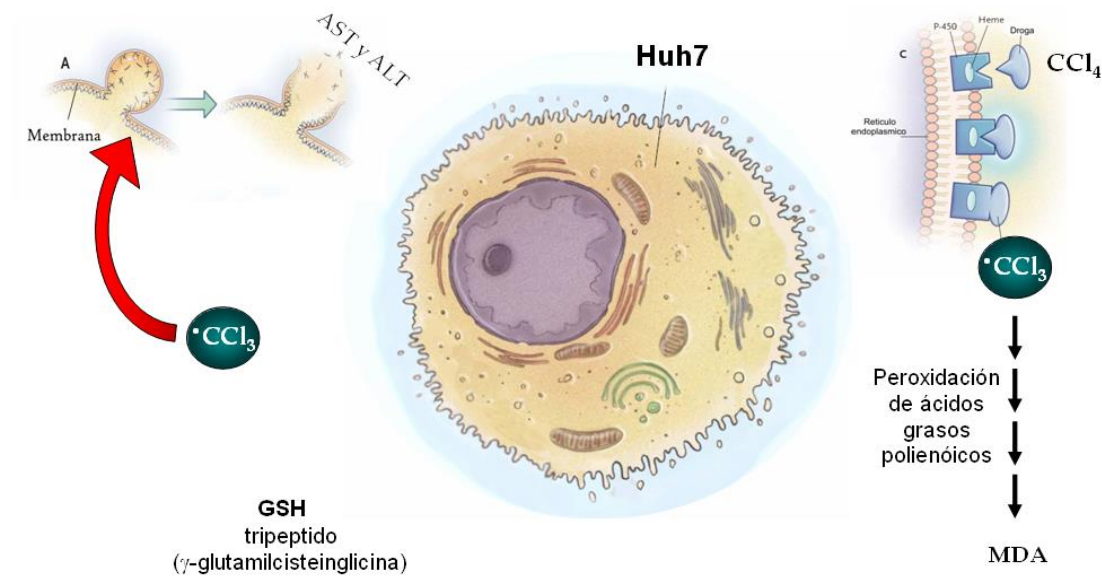


Figura 2. Representación del mecanismo de acción del CCl_4 .

Un incremento significativo de los niveles de estas enzimas es indicativo de daño celular (Shyamal *et al.*, 2006). Las transaminasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo amino de los aminoácidos a los cetoácidos. La AST se encuentra en concentraciones altas en el músculo cardíaco, las células hepáticas y las células del músculo esquelético e igualmente, en menor grado, en otros tejidos. Aunque un nivel elevado de AST en el suero no es específico de la enfermedad hepática, se usa principalmente para diagnosticar y controlar el curso de esta enfermedad, en combinación con otras enzimas como la ALT, fosfatasa alcalina y bilirrubina. El rango normal es de 10 a 34 UI/L. Su importancia radica en ser indicadores de la afectación de las células hepáticas pues las enfermedades que afectan estas células producen la liberación de estas enzimas, sus niveles

marcadamente aumentados en la sangre indican una destrucción de las células hepáticas (Shyamal *et al.*, 2006).

El malondialdehído (MDA) es un producto directo de la acción de los radicales libres de oxígeno (RLO) sobre los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular. Estos radicales libres atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y lipoproteínas transformándolos en ácidos grasos peroxidados, los cuales sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando malondialdehído, de tal manera que la concentración sérica de MDA, es proporcional a los ácidos grasos poliinsaturados oxidados y por lo tanto un buen indicador de peroxidación lipídica. Sus niveles séricos basales de acuerdo a datos de referencia oscilan de valores no detectables a 2.0 mmol/L (Manna *et al.*, 2006).

Por otro lado, el glutatión (GSH) es un tripéptido constituido por tres aminoácidos: glicina, cisteína y ácido glutámico. El 2-amino-5-[[2-[(carboximetil) amino]-1-(mercaptometil)-2-oxoetil] amino]-5-ácido

oxopentanóico, es una γ -glutamilcisteinglicina distribuido ampliamente en animales y plantas. Es una antioxidante intracelular para lo cual utiliza el grupo tiol de la cisteína como agente reductor. Actúa reduciendo especies reactivas del oxígeno como peróxido de hidrógeno gracias a la enzima glutatión peroxidasa. El GSH sirve como un co-sustrato nucleofílico a la glutatión transferasa en la detoxificación de xenobióticos y es un esencial donador de electrones para la glutatión peroxidasa en la reducción de hidroperóxidos. GSH también está implicado en el transporte de aminoácidos y mantenimiento del estado de proteínas por reducción de sulfihídricos. Se produce en forma natural en las células animales y lo

podemos obtener de la dieta diaria en alimentos tales como frutas y vegetales frescos o congelados, pescados, carnes, espárragos, aguacate y nueces. Es un auxiliar para la desintoxicación de las células del hígado debido a que ésta proteína tiene una excelente capacidad de reaccionar con sustancias tóxicas (acetaminofén, cobre, cadmio y paracetamol) y favorecer su eliminación. En plasma su concentración es 0.05 mM y en hígado 5 a 7 mM (Ljubuncic *et al.* 2006).

1.4 Justificación.

Debido a que se ha reportado que hasta un 30% de los pacientes que asisten a Clínicas de Hígado utilizan los remedios herbales para el tratamiento de las enfermedades hepáticas, se considera necesario evaluar la posible actividad antioxidante y hepatoprotectora de algunas de las plantas de la región noreste de México a través de un modelo *in vitro* y a futuro aislar principios activos de dichas plantas con potencial acción hepatoprotectora.

1.5 Objetivo General.

Evaluar la actividad antioxidante y hepatoprotectora de extractos de plantas a través de un modelo *in vitro*.

1.6 Objetivos específicos.

1. Realizar una búsqueda bibliográfica de plantas del noreste de México utilizadas comúnmente en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades hepáticas.
2. Obtener extractos hidroalcohólicos de la parte aérea (flor, tallo-hojas) y /o raíz de cada una de las plantas seleccionadas.
3. Evaluar la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos obtenidos.
4. Evaluar la actividad hepatoprotectora de los extractos hidroalcohólicos en la línea celular de hepatoma Huh7 expuesta a tetracloruro de carbono.
5. Obtener subfracciones del extracto hidroalcohólico con mayor actividad hepatoprotectora utilizando solventes de diferente polaridad.
6. Evaluar la actividad antioxidante y hepatoprotectora de las subfracciones en la línea celular de hepatoma Huh7 expuesta a tetracloruro de carbono.

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

2.1 Material

2.1.1 Reactivos y solventes.

- Agua bidestilada.
- Agua miliQ.
- Alcohol etílico absoluto anhidro, J.T.Baker.
- n- hexano 95%, ACS Fermont Lote 708334.
- Acetato de etilo, Fermont Lote 603433.
- n-butanol, Fisher Chemicals Scientific Lote 042394.
- Silibinina, Sigma-Aldrich Chemical Co.
- DPPH (Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), Sigma-Aldrich Chemical Co.
- Dimetil sulfóxido, ACS Research Organics Lote W58196.

Marca Cayman Chemical

- Acido tiobarbitúrico (vial con 0.53 g de acido tiobarbitúrico).
- Ácido acético (vial con 50 mL).
- Hidróxido de sodio (vial con 50 mL).
- Solución de dodecil sulfato de sodio (vial con 30 mL).
- Estándar de MDA (vial con 20 mL de 100nmol/mL de malondialdehído Bis(dimetilacetal).
- Agua desionizada estéril (vial con 100 mL).
- Amortiguador de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico, fosfatos y EDTA (vial con 11.25 mL).
- Mezcla de cofactor NADP⁺ y glucosa-6-fosfato (vial con 0.45 mL).

- Mezcla de glutatión reductasa y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (vial con 2.1 mL).

- Acido 5,5' –ditiobis-2-nitrobenzoico (vial con 0.45 mL).

Marca Gibco Invitrogen.

- Médio de cultivo Dulbecco (Dulbecco´s Modified Eagle Médium; D-MEM).

- Suero fetal bovino (serum bovine fetal; SBF).

- Tripsina 1x.

- Antibiótico 100x (100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina).

- Solución salina amortiguadora de fosfatos (phosphate buffer saline; PBS) 1x en tabletas. (10 mM de fosfatos, 150 mM de cloruro de sódio, pH 7.2 a 7.3).

- Azul tripano 0.4% Lote 1293059.

- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol –2-il)-2,5-difenil-2H- tetrazolium (MTT) LoteX62920.

2.1.2 Material herbario

La selección de las plantas se llevó a cabo bajo criterios etnofarmacológicos y quimiotaxonómicos con la ayuda del Biólogo Humberto Sánchez quien orientó sobre la localización, la relación taxonómica con otras plantas reportadas con actividad antioxidante. Un espécimen de cada planta colectada se envió al Herbario Institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León para determinar su clasificación taxonómica correcta. Las plantas seleccionadas bajo estos criterios fueron *Centaurea americana*, *Juglans mollis*, *Krameria ramosissima* y *Turnera diffusa*.

2.1.3 Material Biológico.

Se utilizó la línea parental de hepatoma humano Huh7 (Figura 3), donada por el Dr. A. Koromilas (Lady Davies Insitute, McGill University, Canadá).



Figura 3. Fotografía de la línea celular Huh-7 parental en medio D-MEM suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico

2.1.4 Material General.

- Licuadora osterizer.
- Molino.
- Embudo Pyrex de vidrio.
- Matraces Erlenmeyer Pyrex de 1000 mL.
- Matraces bola Pyrex de 1000 mL.
- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.
- Tubos de ensaye de 12 x 75 mm.
- Gradillas.
- Celdas de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico.
- Papel filtro Whatman No.1.
- Canicas.

- Pipeta multicanal marca Labnet, para volumen de 50 a 300 μL .
- Pipeta automática de volumen ajustable marca BioPet, para volumen de 0.5 a 10 y de 10 a 100 μL .
- Pipeta de volumen ajustable marca Finnpipette, para volumen de 40 a 200 μL
- Pipetas automáticas de volumen ajustable marca Wilson para 200 y 1000 μL
- Puntillas para pipeta automática de volumen ajustable p200, p300, p1000 Marca Corning.
- Pipetas serológicas estériles, desechables, empaque individual plastificado, con graduación de 1/10 mL, capacidad de 5 y 10 mL.
- Botella para cultivo celular con ventilación de 75 cm^2 , con capacidad de 300 mL, triangular, cuello recto, tamaño de membrana: 0.22 μm .
- Placas para cultivo celular de 6 pozos, fondo plano, estériles.
- Tubos de fondo cónico, estériles, graduados, para volumen de 15 y 50 mL
- Tubos para microcentrífuga no estériles con graduación hasta 0.65 mL y hasta 2 mL.

2.2 Equipo.

- Balanza analítica Denver Instrument APX-200.
- Equipo de rotaevaporación Yamato RE500.
- Espectrofotómetro UV-Visible Beckman DU 7500 con arreglo de diodos.
- Campana de Bioseguridad II Tipo A2 Marca Nuaire.
- Centrífuga Thermo Electro Corporation Centra CL2.
- Microscópio Olympus CKX41.
- Incubadora CO₂ Water-Jacketed Incubator Autoflow Marca Nuaire.
- Centrífuga refrigerada Heraeus Biofuge primo R.
- Baño de ultrasonido Branson 3510.
- Agitador mecánico Labnet Vortex VX100.
- Lector de microplacas Multiskan Ex Labsystems.
- Sistema de química seca Vitros Systems Chemistry módulo central y DTSCII de Ortho-Clinical Diagnostics.
- Agitador mecánico Daigger Model 22406.
- Estufa Marca Blue M.
- Espectrofluorómetro LS45 Perkin Elmer.
- Lector de microplacas “ Expert Plus” con filtro lectura de 405 nm.
- Ultracongelador So-Low a - 80°C.

2.3 Métodos.

2.3.1. Búsqueda Bibliográfica.

Se realizó una búsqueda bibliográfica en:

*Línea. Pubmed, Medline, EMBASE, EBM Reviews - Cochrane Controlled Trials Register, AMED (Allied and Complementary Medicine), EBM Reviews-ACD Journal Club, and MD Consult utilizando las palabras clave de hepatoprotective effect of extracts, hepatoprotective activity of extract, hepatopreptive plants of México, plants of Mexico by liver diseases.

*Libros. “Remedios para mas de 200 Enfermedades, Hierbas curativas” de Michael Castleman, “ Therapeutic Guide to Herbal Medicines “ de Busses *et al.*, “Plantas medicinales, virtudes insospechadas de plantas conocidas” Selecciones de Reader's Digest, “Manual de Herbolaria Mexicana” de Dra. Carmen Suero.

*Encuesta. Aplicada a los pacientes que consultan en la Unidad de Hígado del Hospital Universitario “Dr. José E. González”.

*Se acudió con el Biólogo Botánico Humberto Sánchez experto en plantas de la región noreste para tener un guía en la disponibilidad de plantas, temporadas de recolección, así como la identificación de la planta para su recolección.

2.3.2 Obtención de extractos hidroalcohólicos.

Cada planta se secó a temperatura ambiente por dos semanas, y trascurrido este tiempo se separó en la parte aérea (flor, fruto, tallo-hoja, corteza), y en raíz de acuerdo a cada planta. Las partes de la planta se molieron en licuadora finamente, en algunos casos se utilizó previamente un molino. Una vez molido el material se almacenó en bolsas etiquetadas con la fecha y el lugar de recolección, para su posterior uso.

Del material previamente molido se pesó 50 g y se colocó en un matraz erlenmeyer de 500 mL, se realizó 2 extracciones con 350 mL y una con 300 mL de etanol:agua en proporción 90:10 mediante agitación en placa con barra magnética por 30 minutos en cada extracción. Los extractos se recuperaron por filtración gravitacional, el solvente se evaporó a presión reducida a 37°C. Se recuperó el extracto por raspado y este se secó en estufa y almacenó para su posterior uso.

2.3.3 Obtención de las subfracciones a partir del extracto hidroalcohólico seleccionado.

Se pesó 10 g del extracto hidroalcohólico de flor de *Centaurea americana* y se resuspendió en 300 mL de etanol:agua (10:90) (fue necesario sonificar para lograr la suspensión homogénea del extracto). Una vez obtenida dicha suspensión se vació a un embudo de separación, y se procedió a realizar 3 extracciones para cada solvente (200 mL cada una) con n-hexano, acetato de etilo y n-butanol, quedando al final un residuo acuoso. Todos los extractos obtenidos se evaporaron a presión reducida a 37°C y se obtuvieron por raspado. Se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

2.3.4 Medición de la actividad antioxidante del extracto.

La actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos se evaluó en términos de la capacidad de captura de radicales libres, usando el radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), de acuerdo a lo descrito por Naik E.H. (2002) y Lee S.E. (2003).

Procedimiento.

1. Se preparó una solución de extracto a una concentración de 1 mg/mL en etanol al 100%, como control positivo se utilizó la quercetina.
2. Se preparó una solución de DPPH a una concentración de 0.2 mg/mL en etanol al 100%.
3. Se mezcló 500 μ L de las soluciones preparadas en el tubo correspondiente y se dejó en oscuridad por 30 minutos.
4. Una vez transcurrido el tiempo se midió la absorbancia de la muestra a 517 nm en un espectrofotómetro.

$$\% \text{ Reducción} = (A - B) \times 100 / A$$

A= absorbancia de la solución DPPH.

B= absorbancia del extracto con DPPH.

2.3.5 Cultivo celular.

2.3.5.1 Congelamiento de línea parental Huh7.

1. Se retiró el medio de cultivo de la botella con 70% a 80% de confluencia celular, utilizando la bomba de vacío o el pipetor.
2. Las células se lavaron con 5 mL de PBS 1x ó con medio D-MEM, y posteriormente se retiró dicho volumen.

3. Se agregó 3 mL de tripsina 1x a las botellas T-75 cm² y se incubó durante 5 minutos a 37°C ó el tiempo necesario para que las células se despegaran de la superficie de la botella de cultivo (nunca fue mayor de 15 minutos, pues podían dañarse las células).
4. Las células de un par de botellas se colectaron en un tubo falcón de 15 mL y se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 revoluciones por minuto (rpm).
5. Una vez centrifugado el tubo se retiró la tripsina y se resuspendió suavemente el botón de células con 3,700 µl de SFB (2 frascos de T-75 cm² son 4 crioviales).
6. Se agregó 75 µL de DMSO (con el propósito de preservar la membrana celular al conservar a -80°C) a un criotubo + 925 µL de suspensión de células en SFB.
7. Se homogeneizó con la punta de la pipeta.
8. Inmediatamente se colocó en hielo y una vez terminado el procedimiento para todos los crioviales se preservaron a -80°C.

2.3.5.2 Mantenimiento de la línea celular Huh7.

1. Se retiró el medio de cultivo de la botella con 70% - 80% de confluencia celular, utilizando la bomba de vacío o el pipetor.
2. Se agregó 3 mL de tripsina 1x a las botellas T-75 cm² y se incubó durante 5 minutos a 37°C ó el tiempo necesario para que las células se despegaran de la superficie de la botella de cultivo (nunca fue mayor de 15 minutos, pues podían dañarse las células).

3. Las células se colectaron en un tubo falcón de 15 mL y se centrifugaron durante 8 minutos a 2,500 rpm.
4. Una vez centrifugado el tubo se retiró la tripsina y se resuspendió suavemente el botón de células con 1 mL de medio suplementado con 10% de SBF y 1% antibiótico.
5. Se tomó una alícuota del volumen contenido en el tubo y se agregó a una nueva botella de cultivo que contenía previamente 9 mL de medio suplementado.
6. Se colocó en la incubadora en condiciones estándar (37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂) y se verificó crecimiento celular al día siguiente.

2.3.5.3. Plaqueo celular.

1. Se siguió el procedimiento descrito antes para el mantenimiento celular hasta el punto 5.
2. A partir de la suspensión celular obtenida se tomó 10 µL y se agregó a un tubo que contenía 70 µL de azul tripano (siendo la dilución realizada 1:8).
3. De la dilución anterior se tomó 10 µL y se colocó en una cámara de Neubauer (Figura 4), para realizar el conteo.
4. El conteo se realizó tomando en cuenta solamente las células no teñidas con el colorante azul tripano.

El conteo celular se realizó en los cuadrantes 1, 2, 3 y 4 de la cámara de Neubauer.
5. Se realizó el conteo por duplicado.

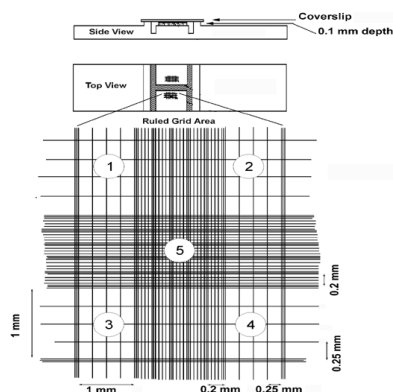


Figura 4. Cámara de Neubauer.

6. Se calculó el número de células a tomar por las siguientes fórmulas:

Promedio de células = Sumatoria del número de células en cada cuadrante/4

Células / mL = (Total de células por cuadrante) (factor de dilución) (10^4)

Total de células = (células por mL) (volumen de la suspensión celular)

7. De acuerdo a los cálculos obtenidos se tomó la cantidad de suspensión necesaria para colocar en cada pozo 1,000,000 de células en 2 mL de medio suplementado.

8. Las células se incubaron a una temperatura de 37°C y a una atmósfera húmeda de 5% de CO₂, durante 12 horas.

2.3.6 Medición de la viabilidad celular después de la exposición de la línea Huh7 al extracto hidroalcohólico.

Para evaluar la toxicidad del extracto utilizado se realizó la prueba de reducción de MTT descrita por Mosmann (1983). Este análisis colorimétrico se basó en la conversión de la sal de tetrazolium (MTT; bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol -2-il)-2,5-difeniltetrazolium), un substrato de color amarillo claro, a cristales de formazan, un producto púrpura. La reacción de reducción

celular implicó los cofactores de nucleótidos de piridina $\text{NAD}^+/\text{NADPH}$ y la enzima mitocondrial deshidrogenasa, que solo ocurre en las células vivas (Figura 5). El producto de formazan es impermeable a la membrana celular, acumulándose dentro de la célula. Los cristales de formazan salen de la célula cuando se agrega un agente lisante, permitiendo la cuantificación del producto formado. La intensidad del producto medido a 550-620 nm fue directamente proporcional al número de células vivas en cultivo. (Mosmann , 1983)

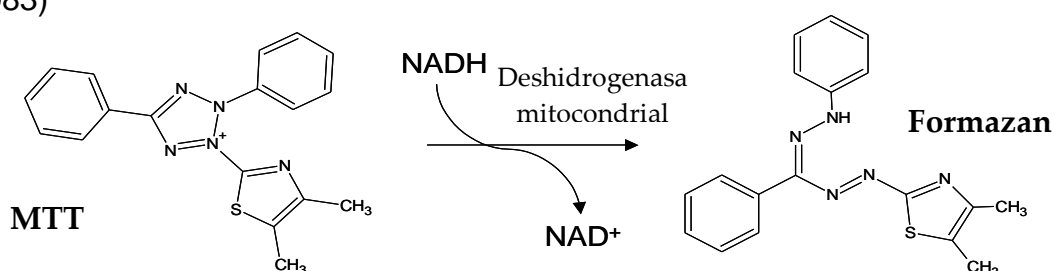


Figura 5. Estructura molecular de MTT y su producto.

El siguiente procedimiento se realizó en placa de 96 pozos:

1. Se sembró 20,000 células/pozo en placa de 96 pozos.
2. Al día siguiente se retiró el medio de cultivo y se realizó el procedimiento de toxicidad y hepatoprotección del extracto a evaluar. Se incluyó un control de medio.
3. Se retiró el sobrenadante.
4. Se agregó 22 μL de MTT (5mg/mL) recién preparado y se incubó por 2 horas, 30 min a 37°C.
5. Se retiró la solución con precaución.
6. Se agregó 100 μL de DMSO en cada pozo para disolver los cristales de formazan.
7. Se mezcló en agitador a velocidad baja por 8 minutos.

8. Se determinó la absorbancia a 570 nm en lector de microplacas.

Debido a que las condiciones utilizadas para el ensayo de toxicidad y hepatoprotección debían ser similares, el procedimiento anterior se modificó para utilizar placas de 6 pozos, siendo el procedimiento final el que se describe a continuación:

1. Se colocó un millón de células en placas de 6 pozos.
2. Al siguiente día se retiró el medio de cultivo y se añadieron concentraciones de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ de extracto disueltos en DMSO (0.05%) y amortiguador de fosfatos, al pozo identificado como control de crecimiento y control de silibinina se agregó lo mismo excepto extracto de planta y 100 $\mu\text{g/mL}$ de extracto respectivamente.
3. Se incubó por 60 minutos.
4. Se retiró el sobrenadante y se mantuvo en hielo hasta su determinación enzimática.
5. Se agregó 150 μL de MTT (5 mg/mL) a cada pozo y se incubó durante 2 horas 30 minutos a 37 °C.
6. Se retiró la solución anterior y se agregó 560 μL de DMSO en cada pozo para disolver los cristales de formazan.
7. Se mezcló en agitador durante 8 minutos a 25 rpm.
8. Se transfirió 200 μL de esta solución a una placa de 96 pozos y se determinó la absorbancia a 570 nm.

El volumen del extracto se tomó a partir de una solución de 20 mg/mL de etanol:agua (90:10). Se calculó el % de viabilidad celular en cada pozo a partir de los resultados obtenidos del control sin tratamiento.

2.3.7 Evaluación de la hepatoprotección por extracto de planta sobre Huh7.

2.3.7.1 Modelo de daño inducido por CCl₄.

Para este propósito se estableció la dosis de CCl₄ necesaria para inducir daño y el tiempo de exposición, se evaluó diferentes dosis (20, 40 y 60 mM) y tiempos de exposición (1, 2 y 3 horas).

El procedimiento realizado fue el siguiente:

1. Se realizó el procedimiento descrito para plaqueo celular.
2. Al día siguiente se retiró el medio y se agregó las diferentes dosis del agente inductor de daño en DMSO (0.05%). Se incubó a los tiempos establecidos. Se incluyó un control sin tratamiento.
3. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se guardó en hielo para su determinación enzimática.

2.3.7.2 Evaluación de la actividad hepatoprotectora de los extractos hidroalcohólicos.

Para evaluar la actividad hepatoprotectora se realizó el procedimiento descrito por Sureshkumar S., *et al.* (2006).

Procedimiento.

1. Se analizaron dosis de 10, 100 y 1000 µg/mL de extracto durante 1 hora.
2. Posteriormente se agregó la concentración de CCl₄ 40 mM por 2 horas.

3. Se retiró entonces por raspado las células y sobrenadante.
4. Se centrifugó a 2,500 r.p.m. por 8 minutos a 4°C.
5. Se transfirió el sobrenadante a un tubo y se tomaron 100 µl de esta solución para resuspender las células.
6. El sobrenadante se mantuvo en hielo hasta su determinación enzimática.

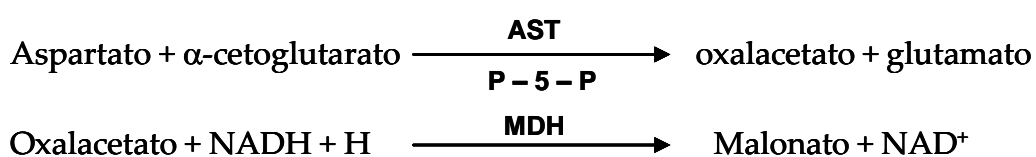
2.3.7.3 Determinación de transaminasas.

El daño celular fue cuantificado por las transaminasas (AST y ALT) liberadas al medio de cultivo. Estas fueron medidas en el sistema de química seca Vitros Systems Chemistry modulo DTSCII de Ortho-Clinical Diagnostics.

2.3.7.3.1 Determinación de AST.

La laminilla de AST Vitros es un soporte de plástico que contiene multicapas de reactivos (lactato deshidrogenasa, malonato deshidrogenasa (MDH), aspartato de sodio, α -cetoglutarato de sodio, dinucleótido de nicotinamida reducido, piridoxal-5- fosfato de sodio) para determinar la actividad de la aspartato aminotransferasa en 10 µL de muestra. El resultado se reportó en UI/L y se midió a una longitud de onda de 340 nm. El análisis se basó en un acoplamiento de la enzima con la oxidación de NADH a NAD⁺, el proceso de oxidación se monitoreó por espectrofotometría de reflectancia a 37°C, este rango de cambio se utilizó para calcular la actividad enzimática.

La reacción que ocurrió se muestra en la siguiente secuencia:

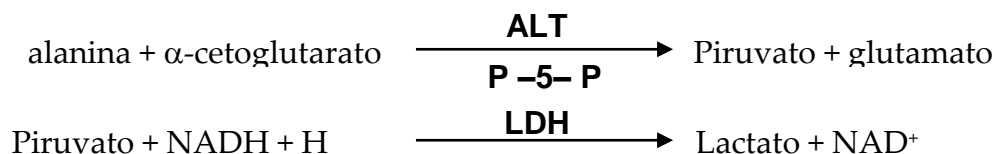


El rango lineal reportado para este ensayo fue de 4 - 950 UI/L (Bergmeyer et al., 1980).

2.3.7.3.2. Determinación de ALT.

La laminilla de ALT Vitros es un soporte de plástico que contiene multicapas de reactivos (lactato deshidrogenada, L-alanina, α -cetoglutarato de sodio, dinucleótido de nicotinamida reducido, piridoxal- 5- fosfato de sodio) para determinar la actividad de la ALT en 10 μ L de muestra. El resultado se reportó en UI/L y se midió a una longitud de onda de 340 nm. El análisis se basó en un acoplamiento de la enzima con la oxidación de NADH a NAD⁺, el proceso de oxidación se monitoreó por espectrofotometría de reflectancia a 37°C, este rango de cambio se utilizó para calcular la actividad enzimática.

La reacción que ocurrió se muestra en la siguiente secuencia:



El rango lineal reportado para este ensayo fue de 3 - 950 UI/L (Wachtel et al., 1995).

2.3.8 Medición de la peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica inducida por el estrés oxidativo fue medida por la cuantificación de las especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), expresándose este resultado como equivalentes de MDA. En este caso el MDA forma un aducto con el ácido tiobarbitúrico en proporción 1:2, el cual se mide por espectrofluorometría. Las muestras biológicas contienen una

mezcla de TBARS, incluyendo hidroperóxidos lipídicos y aldehídos, los cuales se incrementan como resultado del estrés oxidativo. Los TBARS retornan a niveles normales en cierto tiempo, dependiendo de la presencia de antioxidantes.

Procedimiento.

Todos los reactivos tomaron temperatura ambiente antes de utilizar.

1. Se agregó 25 μ L de estándar o muestra al tubo correspondiente.
2. Se agregó 100 μ L de solución de SDS a cada tubo y se mezcló en agitador.
3. Se agregó 2.5 mL de reactivo de amortiguador/TBA a cada tubo.
4. Se cubrió cada tubo con una canica de vidrio e incubó a 95°C por 60 min.
5. Se retiró de la incubadora y se colocó en hielo por 10 min.
6. Se centrifugó las muestras a 3000 rpm. por 15 min.
7. Se retiró el sobrenadante de los tubos y se colocó en la cubeta de lectura del equipo.
8. El sobrenadante fue leído con filtro de excitación de 530 nm y filtro de emisión de 550 nm.

La concentración de los equivalentes de MDA en nmol/mL en las muestras se determinó por interpolación en la curva de calibración.

2.3.9 Determinación de glutatión.

El kit de ensayo GSH Cayman utiliza un método optimizado de reciclaje enzimático usando la glutatión reductasa, para la cuantificación de GSH.

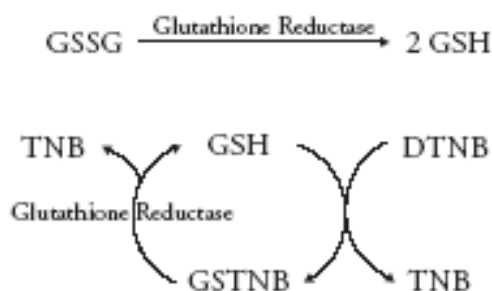


Figura 6. Reciclaje de Glutatión

El grupo sulfhidrilo del GSH reacciona con DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico) y produce al ácido 5-tio-2-nitrobenzoico de color amarillo (TNB). El disulfuro mezclado, GSTNB (entre GSH y TNB) se reduce por la glutatión reductasa para reciclar el GSH y para producir más TNB (Figura 6). El índice de la producción de TNB fue directamente proporcional a la concentración de GSH en la muestra. La medición de la absorbancia de TNB fue a 405 nm.

Procedimiento.

1. Se agregó 50 μL de la muestra a cada pozo designado.
2. Se cubrió la placa con la cubierta plástica.
3. Se preparó la mezcla de reactivos en un vial de 20 mL:
 - Amortiguador MES (11.25 mL)
 - Mezcla de cofactor reconstituido (0.45 mL)
 - Mezcla de enzima reconstituido (2.1 mL)
 - Agua (2.3 mL)

- DTNB reconstituido (0.45 mL)

Nota: Los volúmenes de los reactivos descritos fueron para el uso de toda la placa. Se ajustaron los volúmenes de los reactivos de acuerdo al número de pozos a utilizar en la placa.

- Se preparó la mezcla de reactivos antes de usar y se corrió una curva de calibración de estándares cada vez que el ensayo se realizó.

4. Se removió entonces la cubierta de la placa y se añadió 150 μ l de la mezcla de reactivos recién preparada a cada uno de los pozos que contenían los estándares y las muestras usando una pipeta multicanal. Se reemplazó la cubierta de la placa e incubó la placa en oscuridad en un agitador durante 25 minutos.
5. Posteriormente se midió la absorbancia en los pozos a 405 nm utilizando un lector de microplacas.

2.3.10 Análisis estadístico.

Todos los valores obtenidos fueron expresados como media \pm desviación estándar. Los datos obtenidos fueron analizados con t-student, modelo lineal multivariable y correlación de Pearson en el paquete estadístico SPSS versión 8.0

CAPITULO III

Resultados

3.1 Plantas de la región noreste.

De la búsqueda bibliográfica realizada se obtuvo una lista de 15 plantas que se describen en la flora de la región noreste utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de enfermedades hepáticas o relacionadas quimiotaxonomicamente con otras reportadas en la literatura con este uso.

- | | | |
|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 1. <i>Acasia spp.</i> | 2. <i>Florensia spp.</i> | 3. <i>Citrus spp.</i> |
| 4. <i>Cucúrbita spp.</i> | 5. <i>Juglans spp.</i> | 6. <i>Manihot spp.</i> |
| 7. <i>Opuntia spp.</i> | 8. <i>Physolis spp.</i> | 9. <i>Turnera spp.</i> |
| 10. <i>Quassia spp.</i> | 11. <i>Selaginella spp.</i> | 12. <i>Centaurea spp.</i> |
| 13. <i>Taraxacum spp.</i> | 14. <i>Krameria spp.</i> | 15. <i>Leucophyllum spp.</i> |

3.2 Clasificación taxonómica.

Se recibió una constancia en la cual se anexaron los números de folio de la clasificación taxonómica de los especímenes cotejados por especie de la Jefa de Laboratorio de Fanerógamas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, M.C. María del Consuelo González de la Rosa. En esta lista se incluyeron las cuatro plantas seleccionadas para este estudio de acuerdo a las sugerencias del experto Biólogo Botánico Humberto Sánchez y a su relación quimiotaxonómica con otras especies hepatoprotectoras. Los folios asignados a las cuatro plantas de interés fueron:

❶ *Turnera diffusa*.

8272, 10153, 20919, 12434, 8273, 20910, 1175, 23569, 8567, 9909, 9183, 9445.

❷ *Centaurea americana*.

17624, 12926, 10766, 8717, 21648, 2439, 1366, 649, 505.

❸ *Juglans mollis*.

17854, 19500, 17930, 21800, 3409, 4533, 1400, 3408, 2839, 23894, 23735, 19500, 16467, 19380, 1401, 4468, 21894, 21790, 21828, 4065, 3406, 3147, 2839, 3755, 1402.

❹ *Krameria ramosissima*.

4850, 15932, 21580, 4751, 9070, 1171, 8618, 8617, 8619, 10014, 9877, 9878, 9071, 2744.

Una imagen del espécimen recolectado, así como una descripción de cada una de ellas se menciona a continuación.

3.2.1 *Turnera diffusa*

Figura 7. *Turnera diffusa*
recolectada en Cadereyta, N.L.



Esta planta pertenece a la familia Turneraceae, es conocida comúnmente como Damiana (Figura 7). Otros nombres con los cuales también es conocida esta planta son: hierba de la pastora, hierba del venado, pastorcita. Tiene una distribución geográfica que se extiende desde Texas hasta Sudamérica, es silvestre en la mayor parte de nuestro país, aunque es originaria de Baja California. Crece como un arbusto ramoso de 0.3 a 2 m de altura, sus hojas son aromáticas, rugosas y alternas, con flores amarillas de 8 a 12 mm de longitud. Florece de Julio a Noviembre. Es usada en infusiones, decocción, tintura y fumada. Se describe que la mejor forma de utilizar la planta es empleando 4 g de planta fresca en 120 mL de agua y ser tomada como té, después de los alimentos. Las hojas han sido tradicionalmente utilizadas como estimulante, afrodisíaco, tónico, diurético, laxante, en desordenes de riñón, menstruales y de embarazo. Es empleada también para el dolor de cabeza que viene después del uso exagerado de

bebidas alcohólicas. Así mismo se ha descrito el empleo de esta planta en las enfermedades del sistema gastrointestinal y respiratorio. Los indígenas del norte de México la han empleado para combatir la impotencia sexual. La Farmacopea Mexicana reconoce que la planta actúa como tónico general y diurético. La Farmacopea Herbal Británica enlista las indicaciones específicas para Damiana como ansiedad asociada con impotencia e incluye otras indicaciones como depresión, dispepsia nerviosa, constipación atónica y coito inadecuado. Reportes fitoquímicos reportan que contiene tetrafilina B (un cianoglicosido); gonzalitosina I (un flavonoide); arbutina (un glucósido fenolico); damianina; tricotan-2-ona, hexacosanol (hidrocarbonos); un aceite volátil que contiene α -pinena, β -pinena, *p*-cimena y 1,8-cineola; y β -sitosteol (Cabrera, 2004; Kumar *et al.*, 2005; Mendoza *et al.*, 2005; <http://www.foximas.com/ky/2185732.html>)

3.2.2 *Centaurea americana*



Figura 8. *Centaurea americana* recolectada en el Barrial, Villa de Santiago, N.L.

Pertenece a la familia de las Asteraceae, comúnmente conocida como chancero alegre, flor de canasta, cardo (Figura 8), es una planta anual, nativa del Norte de México en Coahuila y Nuevo León; Arizona, Arkansas, Kansas, Louisiana, Missouri, Nuevo México, Oklahoma y Texas en Estados Unidos y cultivada en varios países. Se han aislado de esta planta una sesquiterpenlactona (cinaropicrina), un dibenzilbutirolactona (americanina), lignanos (arctina, matairesinosida, matairesinol, arctigenina y lapaol), fitoecdisteroides de las semillas de *Centaurea americana*, tales como 20-hidroxiecdisona y makisterona A (Shoeb *et al.*, 2006). Las especies de *Centaurea* se han descrito que tienen actividad antiprotozoaria, antifúngica, hipoglucemiante, anti-inflamatoria, antipirética, antimicrobiana, antiviral, neurotóxica, inmunológica, vasodilatador, antireumática, empleada para malestares gastrointestinales, biliares y como relajante muscular. Se emplea en forma de té o como infusión (Karamenderes *et al.*, 2006; Güven *et al.*,

2005; Arif *et al.*, 2004; Kumarasamy *et al.*, 2003; Panagouleas *et al.*, 2003; Garbacki *et al.*, 1999; Heinrich *et al.*, 1998).

3.2.3 *Juglans mollis*.



Figura 9. *Juglans mollis* recolectada en el Potrero, Villa Aldama, N.L.

Esta planta pertenece a la familia Juglandaceae. Se le conoce con el nombre común de nogal, nogal encarcelado o nogal blanco (Figura 9). Árbol caducifolio, monoico de 18-20 m de altura, con el tronco grueso y la copa amplia. Corteza lisa o gris plateada, fisurada. Ramas erectas y corpulentas. Flores masculinas en amentos verdosos, cilíndricos, colgantes, en grupos de 1-3 sobre las ramillas del año anterior. Florece de Mayo a Junio. Frutos globosos, lisos, verdosos en grupos de 1 a 4 sobre un corto pedúnculo. Se usan las hojas como antidiarreico y tópico cicatrizante, así mismo se ha reportado que posee propiedades anti-inflamatorias y actividad antioxidante (Erdemoglu *et al.*, 2003; Miliauskas *et al.*, 2003; Casas *et.al.*, 1994; Salazar , 2007).

3.2.4 *Krameria ramosissima*.



Figura 10. *Krameria ramosissima* , recolectada en el Potrero, Villa Aldama, N.L.

Esta planta pertenece a la familia Krameriaceae, es conocida como zarzaparrilla (Figura 10) (Simpson, 2007). Se ha descrito su uso en el tratamiento de cáncer estomacal e intestinal, es utilizado como té contra la diarrea y fiebre moderada. Se ha aislado el 2-(2,4,6-trimetoxifenil)-5- (E)-propenilbenzofurano a partir de esta planta. Crece en el centro y noreste de México y la raíz es la empleada para uso medicinal (Pil Ja *et al.*, 2004).

3.3 Obtención de extractos hidroalcohólicos.

Los porcentajes de recuperación obtenidos para cada extracto hidroalcohólico se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Porcentajes de recuperación obtenidos para los extractos hidroalcohólicos.

Extracto	Fecha de recolección	Parte utilizada	% Recuperación	
1	<i>Centaurea americana</i> (Cardo)	Marzo 2006	Flor	8.26 %
			Tallo-Hoja	6.58 %
2	<i>Juglans mollis</i> (Nogal)	Febrero 2006	Fruto	3.50 %
			Hoja-Tallo	7.26 %
			Corteza	4.15%
3	<i>Krameria ramosissima</i> (Zarzaparrilla)	Marzo 2006	Tronco - Flor	6.64 %
4	<i>Turnera diffusa</i> (Damiana)	Marzo 2006	Flor - Tallo	9.58%
			Raíz	1.43%

Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron desde 1.43 hasta 9.58.

3.4 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos obtenidos.

La capacidad de los extractos hidroalcohólicos para reducir el radical libre DPPH se muestra en la tabla 2.

Los porcentajes de reducción del DPPH fueron desde un 53 ± 1.78 para el tronco-flor de *Krameria ramosissima* hasta un 82.4 ± 4.6 de la flor-tallo de

Turnera diffusa. Todos los extractos de las cuatro plantas estudiadas presentaron un porcentaje de reducción de DPPH por arriba de 50.

Tabla 2. Porcentajes de reducción de DPPH obtenidos de los extractos hidroalcohólicos de las plantas evaluadas.

	Extracto	Parte utilizada	% Reducción
1	<i>Centaurea americana</i> (Cardo)	Flor	79 ± 1.6
		Tallo-Hoja	62.5 ± 4.8
2	<i>Juglans mollis</i> (Nogal)	Fruto	68 ± 3
		Hoja-Tallo	80 ± 2
		Corteza	76.8 ± 1
3	<i>Krameria ramosissima</i> (Zarzaparrilla)	Tronco - Flor	53 ± 1.78
4	<i>Turnera diffusa</i> (Damiana)	Flor - Tallo	82.4 ± 4.6
		Raíz	60 ± 5.7

3.5 Evaluación de la actividad hepatoprotectora de los extractos hidroalcohólicos de las cuatro plantas seleccionadas en la línea celular Huh7 expuesta a CCl₄.

3.5.1 Modelo de inducción de daño por CCl₄.

Los valores de AST y ALT a las diversas dosis de inducción de daño, así como los diversos tiempos de exposición por CCl₄, sobre la línea celular Huh7 se muestran en la tabla 3 y figuras 11,12 y 13.

Tabla 3. Resultados de ALT y AST a las dosis evaluadas y tiempos de exposición a CCl₄.

Tiempo de exposición	Concentración de CCl ₄							
	PBS1x + DMSO (0.05%)		20 mM		40 mM		60 mM	
	AST (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)
1 hora	4 ± 0	13 ± 6	11 ± 4	19 ± 3.5	53 ± 1	22 ± 2	77 ± 2	18 ± 4
2 horas	4 ± 0	11 ± 0.6	24 ± 6	31 ± 17	73 ± 25	25 ± 6	82 ± 4	18 ± 4
3 horas	4 ± 0	10 ± 6	12 ± 2	16 ± 3	80 ± 8	80 ± 10	80 ± 8	22 ± 4

Valores expresados como Promedio ± desviación estándar

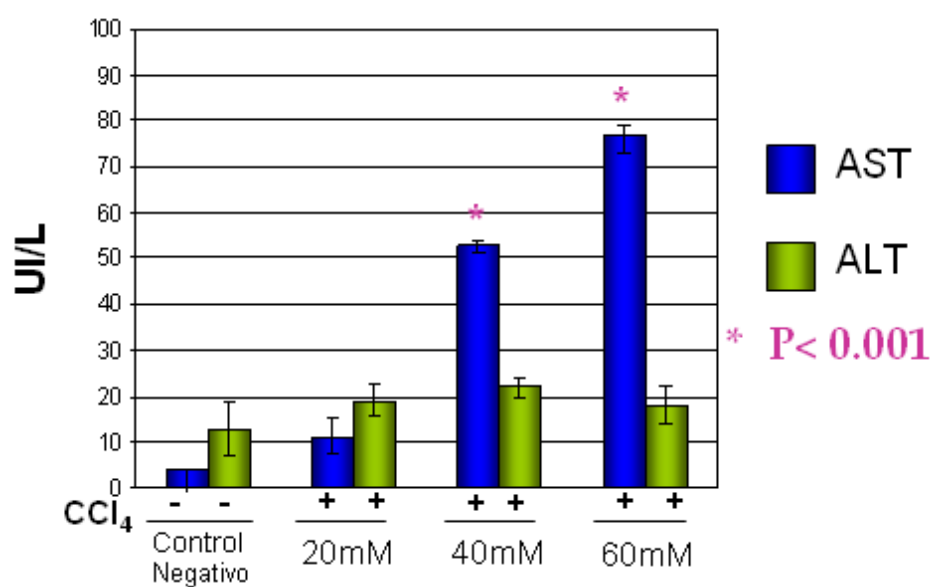


Figura 11. Niveles de AST y ALT después de la exposición de Huh7 a CCl₄ por 1 hora.

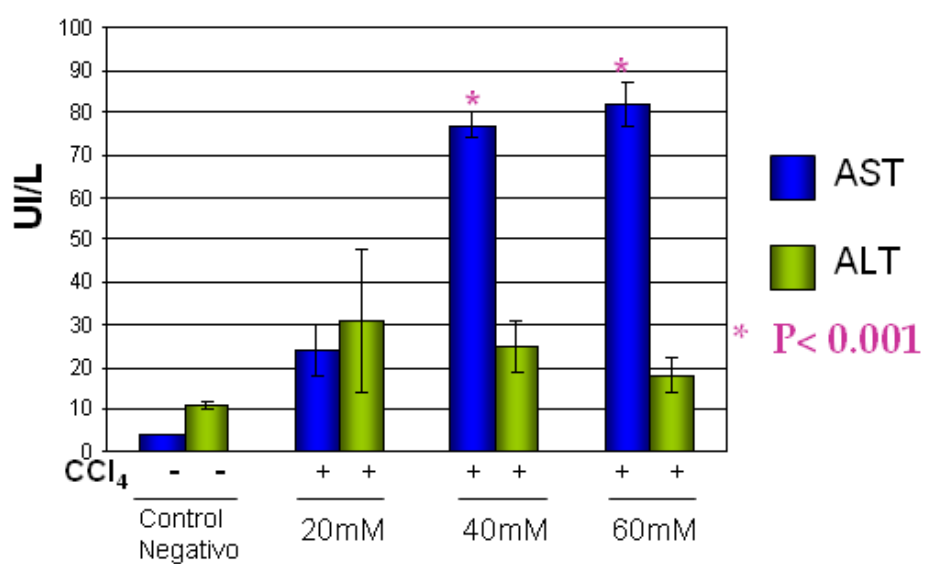


Figura 12. Niveles de AST y ALT después de la exposición de Huh7 a CCl₄ por 2 horas.

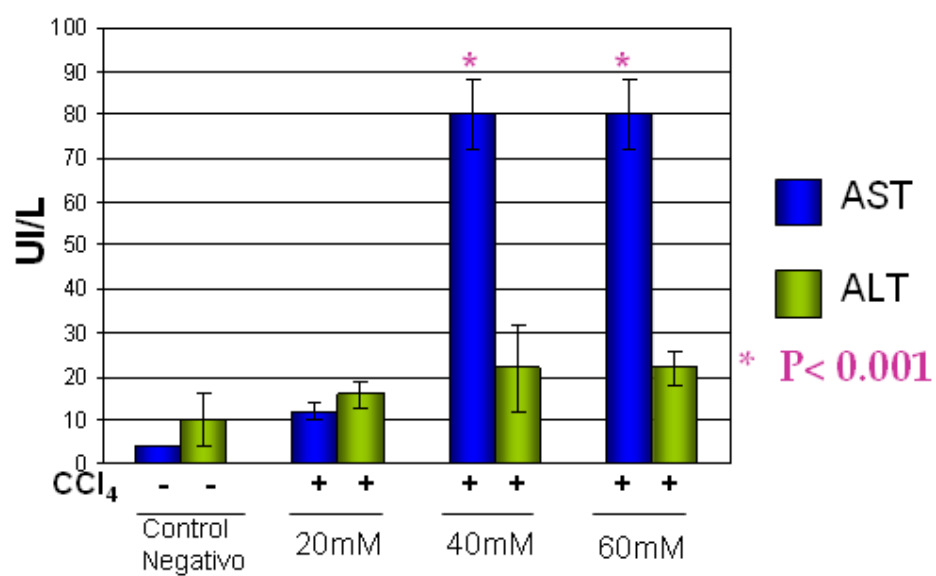
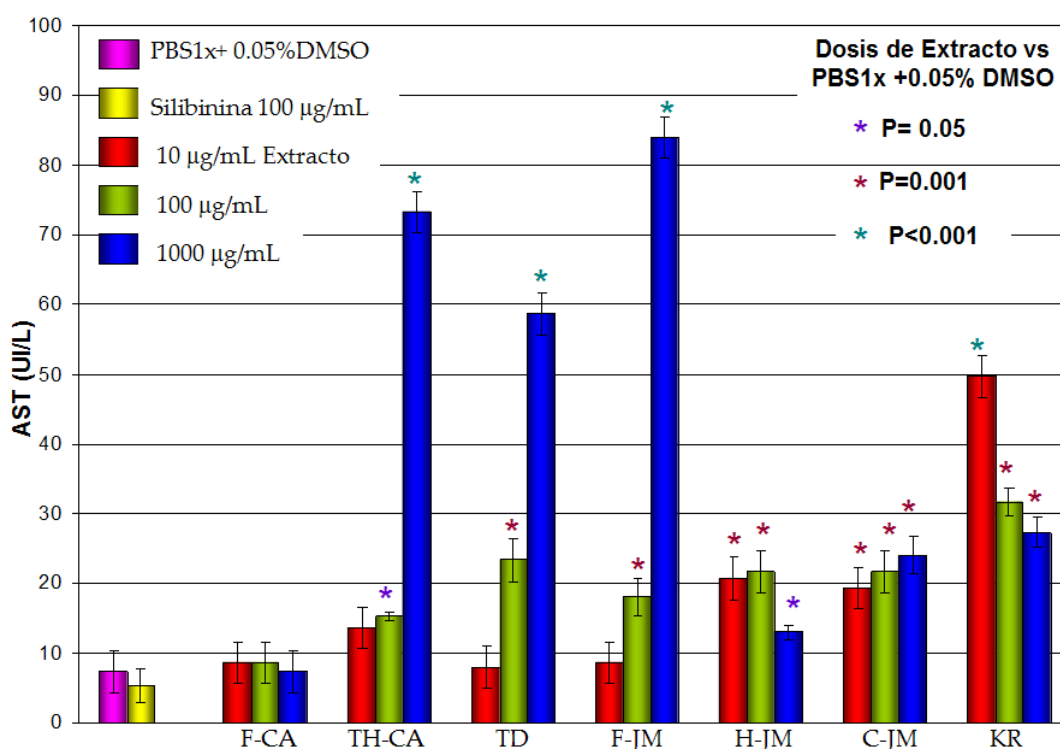


Figura 13. Niveles de AST y ALT después de la exposición de Huh7 a CCl₄ por 3 horas.

3.5.2 Efecto de los extractos hidroalcohólicos sobre Huh7 medido por la liberación de AST.

Se determinó que el extracto de *Centaurea americana* no mostró daño celular a través de la liberación de AST a ninguna de las dosis evaluadas. El resto de los extractos mostraron una relación dosis dependiente para la liberación de AST. A la concentración de 1000 µg/mL se mostró una liberación de AST con significancia estadística ($P < 0.001$) para los extractos de tallo-hoja de *Centaurea americana*, extracto de parte aérea de *Turnera diffusa* y fruto de *Juglans mollis* (Figura 14).

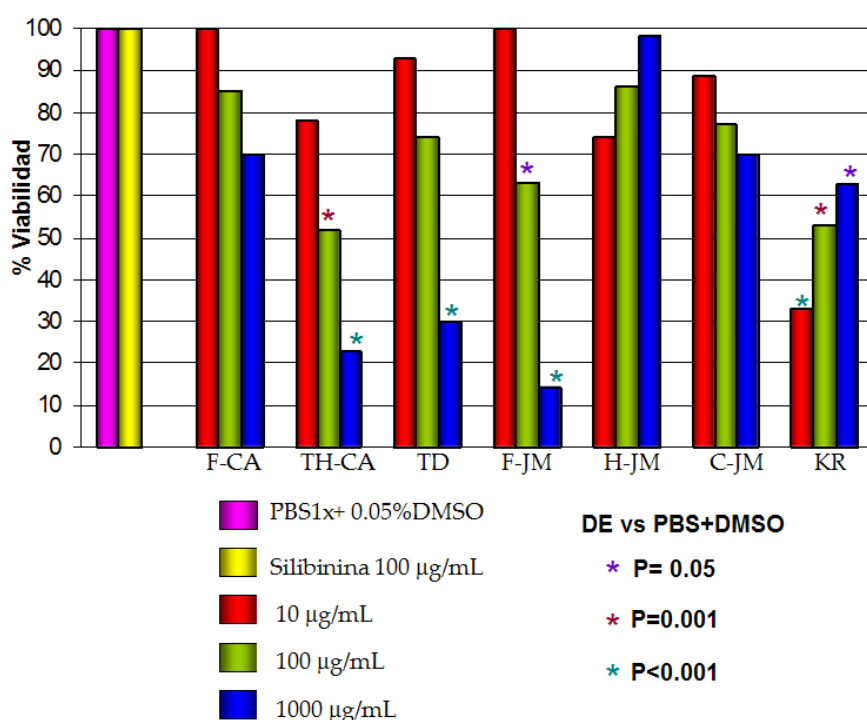


F-CA: extracto de flor de *Centaurea americana*., TH-CA: extracto de tallo-hoja de *Centaurea americana*., TD: extracto de parte aérea de *Turnera diffusa*., F-JM: extracto de fruto de *Juglans mollis*., C-JM: extracto de hoja de *Juglans mollis*., C-JM: extracto de corteza de *Juglans mollis*., K.R.: extracto de *Krameria ramosissima*.

Figura 14. Efecto de los extractos hidroalcohólicos sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en los niveles de AST.

3.5.3 Efecto de los extractos hidroalcohólicos sobre Huh7 medido por el porcentaje de viabilidad celular.

Se determinó que el extracto de flor de *Centaurea americana* no mostró muerte celular a través del porcentaje de viabilidad a ninguna de las dosis evaluadas; para el resto de los extractos se observó una relación dosis dependiente en viabilidad. A concentración de 1000 µg/mL mostraron muerte celular con significancia ($P < 0.001$) los extractos de tallo-hoja de *Centaurea americana*, *Turnera diffusa* y fruto de *Juglans mollis*. No se observó esto para hoja de *Juglans mollis* y corteza de *Juglans mollis* (Figura15).

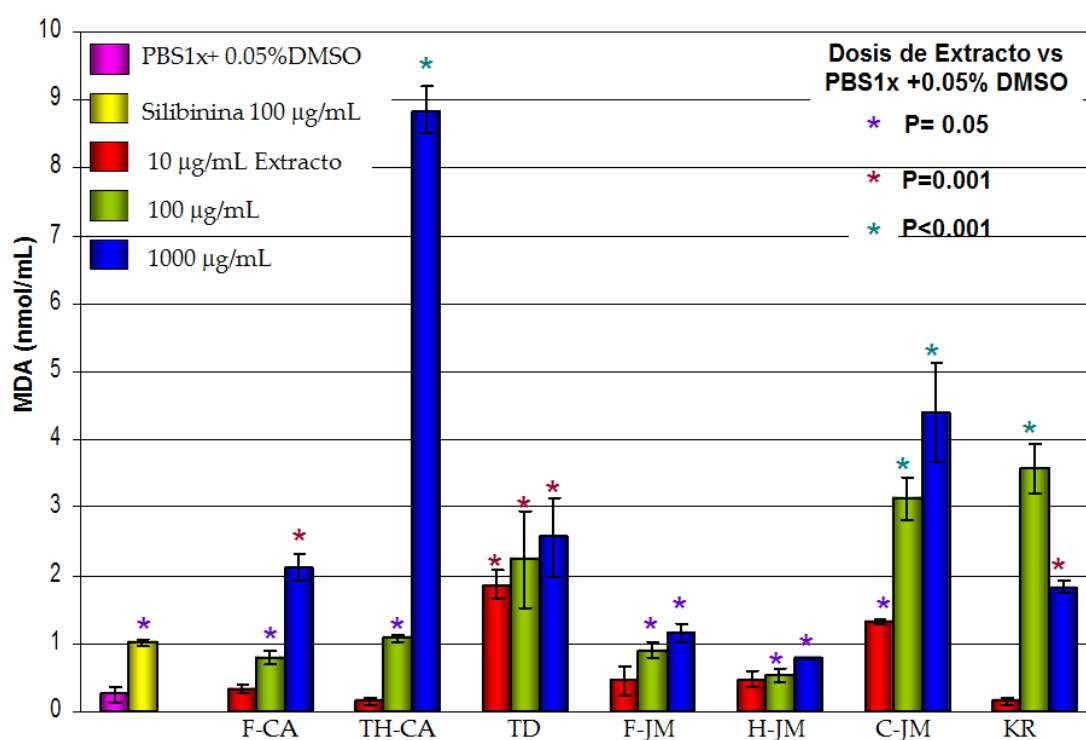


F-CA: extracto de flor de *Centaurea americana*., TH-CA: extracto de tallo-hoja de *Centaurea americana*., TD: extracto de parte aérea de *Turnera diffusa*., F-JM: extracto de fruto de *Juglans mollis*., H-JM: extracto de hoja de *Juglans mollis*., C-JM: extracto de corteza de *Juglans mollis*., K.R.: extracto de *Krameria ramosissima*.

Figura 15. Efecto de los extractos hidroalcohólicos sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en la viabilidad celular.

3.5.4 Efecto de los extractos hidroalcohólicos sobre Huh7 en la producción de Malondialdehído.

Se determinó que existe una relación dosis dependiente de los extractos hidroalcohólicos para la producción de especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (MDA, nmol/mL), excepto para *Krameria ramosissima* (Figura 16).

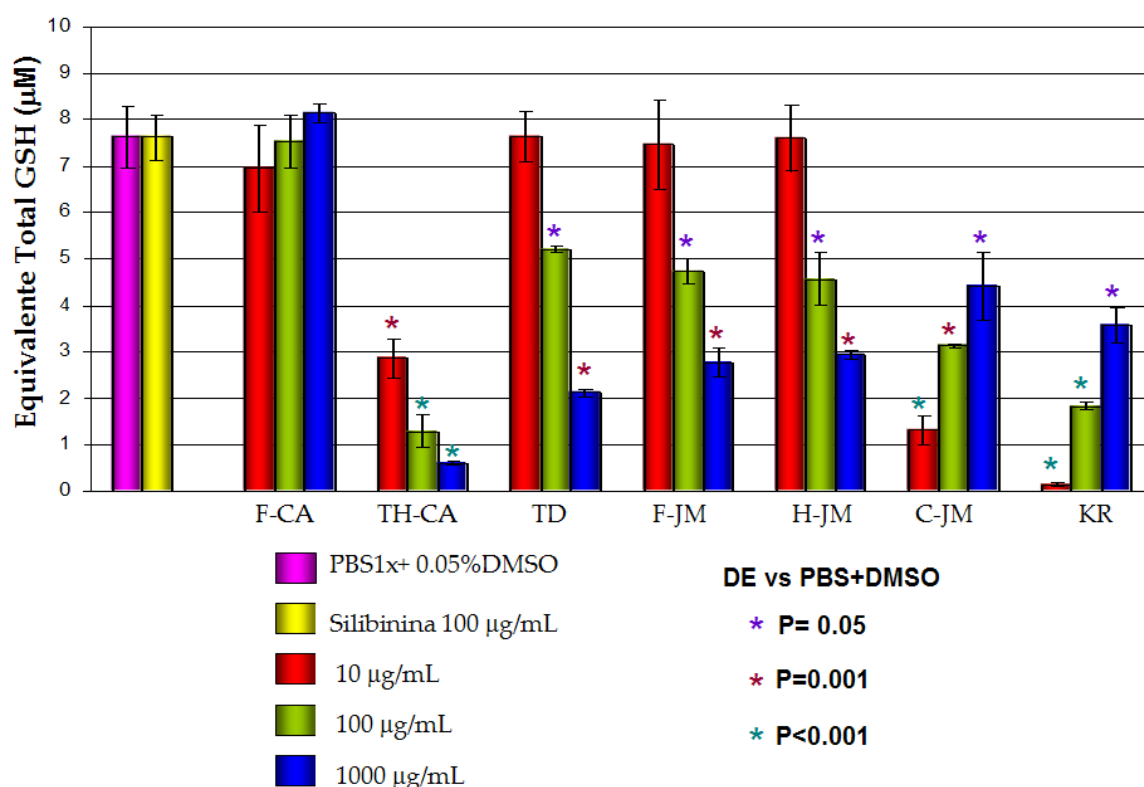


F-CA: extracto de flor de *Centaurea americana*., TH-CA: extracto de tallo-hoja de *Centaurea americana*., TD: extracto de parte aérea de *Turnera diffusa*., F-JM: extracto de fruto de *Juglans mollis*., H-JM: extracto de hoja de *Juglans mollis*., C-JM: extracto de corteza de *Juglans mollis*., K.R.: extracto de *Krameria ramosissima*.

Figura 16. Efecto de los extractos hidroalcohólicos sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en la producción de malondialdehído.

3.5.5 Efecto de los extractos hidroalcohólicos sobre Huh7 en el consumo de glutatión reducido.

Se determinó que para la flor de *Centaurea americana* no hubo disminución significativa de GSH en las células al compararse contra el grupo control sin tratamiento y la silibinina; para los otros extractos se observó una relación dosis dependiente (Figura 17).



F-CA: extracto de flor de *Centaurea americana*., TH-CA: extracto de tallo-hoja de *Centaurea americana*., TD: extracto de parte aérea de *Turnera diffusa*., F-JM: extracto de fruto de *Juglans mollis*., H-JM: extracto de hoja de *Juglans mollis*., C-JM: extracto de corteza de *Juglans mollis*., K.R.: extracto de *Krameria ramosissima*.

Figura 17. Efecto de los extractos hidroalcohólicos sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en el consumo de glutatión reducido.

3.5.6. Efecto de los extractos hidroalcohólicos en la línea celular Huh7 evaluado por AST (UI/L), viabilidad (%), GSH ($\mu\text{M/L}$) y MDA (nmol/L).

Los resultados obtenidos de la evaluación de los extractos hidroalcohólicos de las cuatro plantas utilizadas se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Efecto de los extractos hidroalcohólicos en la línea celular Huh7 evaluado por AST (UI/L), viabilidad (%), GSH ($\mu\text{M/L}$) y MDA (nmol/L).

Identificación		AST (UI/L)	Viabilidad (%)	GSH ($\mu\text{M/L}$)	MDA (nmol/L)
PBS1x+DMSO (0.05%)		7 \pm 3	100	7.62 \pm 0.65	0.25 \pm 0.11
Silibinina 100 $\mu\text{g/mL}$		5 \pm 2	100	7.62 \pm 0.48	1.01 \pm 0.05
Flor de <i>Centaurea americana</i>	10 $\mu\text{g/mL}$	9 \pm 3	100	6.95 \pm 0.92	0.34 \pm 0.06
	100 $\mu\text{g/mL}$	9 \pm 3	79	7.54 \pm 0.57	0.78 \pm 0.10
	1000 $\mu\text{g/mL}$	7 \pm 3	68	8.14 \pm 1	2.12 \pm 0.21
Tallo-Hoja <i>Centaurea americana</i>	10 $\mu\text{g/mL}$	14 \pm 3	78	2.86 \pm 0.43	0.15 \pm 0.04
	100 $\mu\text{g/mL}$	15 \pm 1	52	1.30 \pm 0.36	1.09 \pm 0.05
	1000 $\mu\text{g/mL}$	73 \pm 3	12	0.61 \pm 0.03	8.85 \pm 0.34
Parte aérea <i>Turnera diffusa</i>	10 $\mu\text{g/mL}$	8 \pm 3	93	7.62 \pm 0.80	1.86 \pm 0.21
	100 $\mu\text{g/mL}$	23 \pm 3	80	5.21 \pm 0.80	2.24 \pm 0.71
	1000 $\mu\text{g/mL}$	59 \pm 4	74	2.12 \pm 0.25	2.57 \pm 0.59
Fruto <i>Juglans mollis</i>	10 $\mu\text{g/mL}$	9 \pm 4	100	7.45 \pm 0.95	0.45 \pm 0.22
	100 $\mu\text{g/mL}$	18 \pm 3	63	4.72 \pm 0.86	0.90 \pm 0.12
	1000 $\mu\text{g/mL}$	84 \pm 2	14	2.77 \pm 0.13	1.15 \pm 0.13
Hoja <i>Juglans mollis</i>	10 $\mu\text{g/mL}$	21 \pm 3	74	7.59 \pm 0.97	0.47 \pm 0.12
	100 $\mu\text{g/mL}$	22 \pm 3	61	4.57 \pm 0.56	0.53 \pm 0.10
	1000 $\mu\text{g/mL}$	13 \pm 1	98	2.94 \pm 0.03	0.78 \pm 0.03
Corteza <i>Juglans mollis</i>	10 $\mu\text{g/mL}$	19 \pm 3	89	1.32 \pm 0.77	1.32 \pm 0.04
	100 $\mu\text{g/mL}$	22 \pm 4	90	3.13 \pm 0.05	3.13 \pm 0.31
	1000 $\mu\text{g/mL}$	24 \pm 3	100	4.41 \pm 0.21	4.41 \pm 0.73
Parte aérea <i>Krameria ramosissima</i>	10 $\mu\text{g/mL}$	50 \pm 3	18	0.15 \pm 0.03	0.15 \pm 0.04
	100 $\mu\text{g/mL}$	32 \pm 2	28	1.83 \pm 0.36	3.58 \pm 0.37
	1000 $\mu\text{g/mL}$	27 \pm 2	57	3.58 \pm 0.56	1.83 \pm 0.04

Se observó que no hubo efecto tóxico del extracto de flor de *Centaurea americana* sobre la línea celular Huh7 evaluado a través de los niveles de AST, % de viabilidad, GSH y MDA. Se encontró una correlación entre AST y MTT, AST y MDA, AST y GSH ($P=0.01$) para este extracto. Hubo un efecto tóxico de tallo-hoja de *Centaurea americana* a 1000 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea celular Huh7 ($P< 0.001$ vs control sin tratamiento) evaluado a través de AST, % viabilidad y MDA. Se encontró una correlación entre AST y MTT, AST y MDA, AST y GSH ($P=0.01$) para este extracto.

Hubo un efecto tóxico del extracto de fruto de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de *Juglans mollis* sobre la línea celular Huh7 ($P< 0.001$ vs control sin tratamiento) evaluado a través de AST, % de viabilidad, GSH y MDA. Se encontró una correlación entre AST y MTT, AST y MDA ($P=0.01$) para el extracto de fruto de *Juglans mollis*. No hubo efecto tóxico del extracto de corteza de *Juglans mollis* sobre la línea celular Huh7 evaluado a través de los niveles de AST y % de viabilidad, sin embargo a dosis de 10 $\mu\text{g/mL}$ se observó un incremento de MDA. Se encontró una correlación entre AST y MTT ($P=0.01$) para el extracto de corteza de *Juglans mollis*. No hubo efecto tóxico del extracto de hoja de *Juglans mollis* sobre la línea celular Huh7 evaluado a través de los niveles de AST, % de viabilidad y MDA. Se encontró una correlación entre AST y MTT, AST y MDA ($P=0.01$) para este extracto.

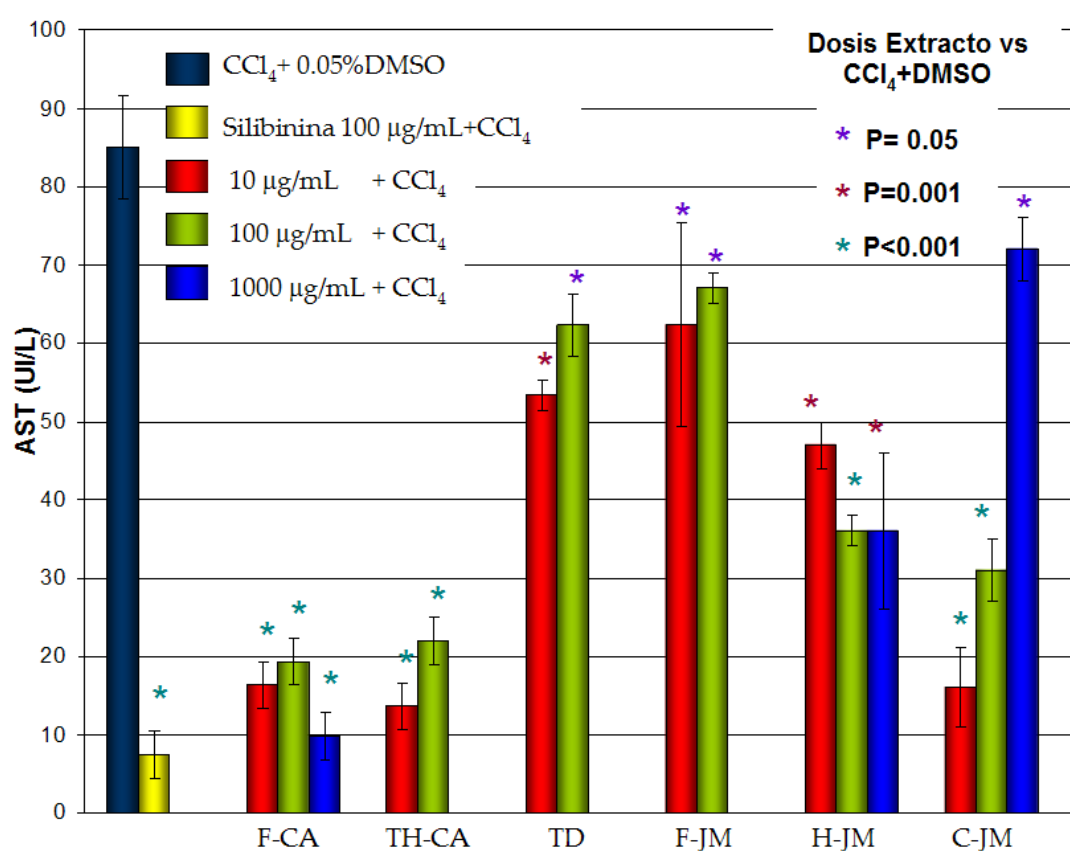
Hubo un efecto tóxico del extracto de tronco-flor de *Krameria ramosissima* a dosis de 10 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea celular Huh7 ($P< 0.001$ vs control sin tratamiento) evaluado a través de AST, % de viabilidad y MDA. Se encontró una correlación entre AST y MTT, AST y MDA ($P=0.01$) para este extracto. Se determinó que hubo un efecto tóxico del extracto de *Turnera diffusa* a

dosis de 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea celular Huh7 ($P < 0.001$ vs control sin tratamiento) evaluado a través de AST, %de viabilidad, MDA y GSH. Se encontró una correlación entre todos los parámetros evaluados para el extracto de tallo-flor de *Turnera diffusa*.

A partir de estos datos se decidió no evaluar la posible actividad hepatoprotectora de aquellas concentraciones de extractos en las cuales se presentó toxicidad del extracto evaluado a través de los mediadores estudiados (Tabla 4).

3.5.7 Efecto hepatoprotector de los extractos hidroalcohólicos sobre Huh7 medido por la liberación de AST.

Se determinó que todos los extractos redujeron el daño por CCl₄ medido por liberación de AST a las concentraciones evaluadas, pero el efecto hepatoprotector fue mayor en flor y tallo-hoja de *Centaurea americana* a las concentraciones de 10, 100,1000 µg/mL y 10, 100 µg/mL, respectivamente (Figura 18).

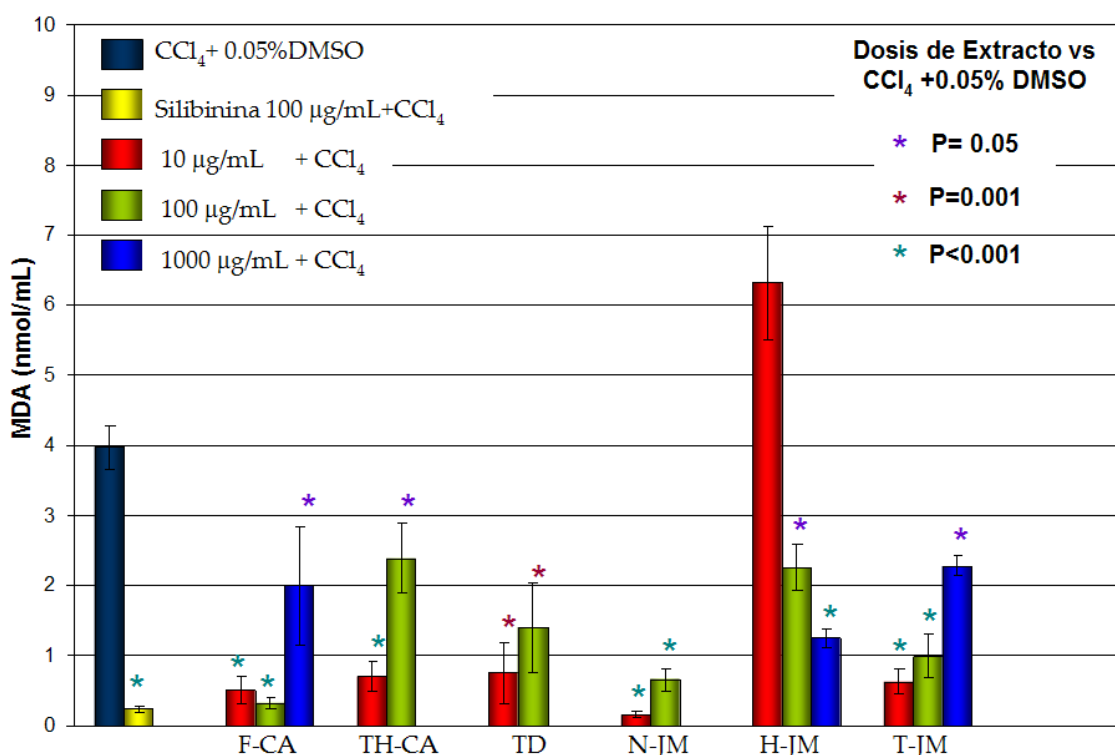


F-CA: extracto de flor de *Centaurea americana*.,TH-CA: extracto de tallo-hoja de *Centaurea americana*.,TD: extracto de parte aérea *Turnera diffusa*.,F-JM: extracto de fruto de *Juglans mollis*.,H-JM: extracto de hoja de *Juglans mollis*.,C-JM: extracto de corteza de *Juglans mollis*.

Figura 18. Efecto de los extractos hidroalcohólicos después de la exposición a CCl₄ 40 mM por 2 horas sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en los niveles de AST.

3.5.8 Efecto hepatoprotector de los extractos hidroalcohólicos sobre Huh7 medido por la producción de malondialdehído.

Se observó que a 10 $\mu\text{g/mL}$ los extractos evitaron la producción de MDA por la célula, excepto hoja de *Juglans mollis*. A 100 $\mu\text{g/mL}$ solo la flor de *Centaurea americana* evitó la producción de MDA (Figura 19).

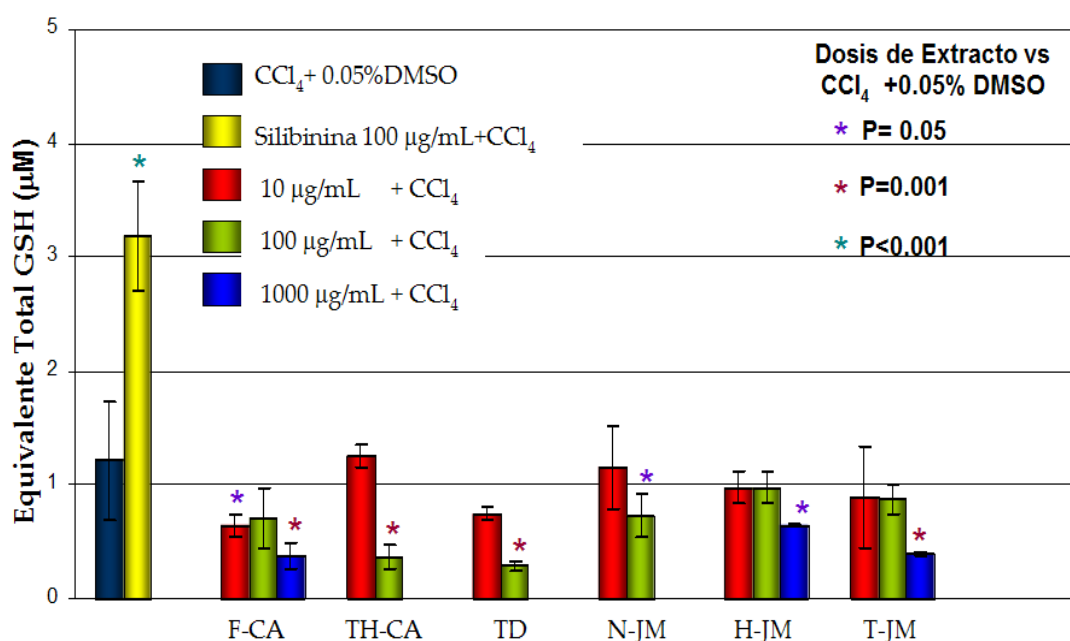


F-CA: extracto de flor de *Centaurea americana*., TH-CA: extracto de tallo-hoja de *Centaurea americana*., TD: extracto de parte aérea de *Turnera diffusa*., F-JM: extracto de fruto de *Juglans mollis*., H-JM: extracto de hoja de *Juglans mollis*., C-JM: extracto de corteza de *Juglans mollis*.

Figura 19. Efecto de los extractos hidroalcohólicos después de la exposición a CCl₄ 40 mM por 2 horas sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en la producción de malondialdehído.

3.5.9 Efecto hepatoprotector de los extractos hidroalcohólicos sobre Huh7 medido por el consumo de glutatión reducido.

Se observó un consumo de GSH tras la exposición con CCl_4 a las concentraciones evaluadas de todos los extractos hidroalcohólicos, sin embargo la silibinina mantuvo su potencial antioxidante en este ensayo (Figura 20).



F-CA: extracto de flor de *Centaurea americana*, TH-CA: extracto de tallo-hoja de *Centaurea americana*, TD: extracto de parte aérea *Turnera diffusa*, F-JM: extracto de fruto de *Juglans mollis*, H-JM: extracto de hoja de *Juglans mollis*, C-JM: extracto de corteza de *Juglans mollis*.

Figura 20. Efecto de los extractos hidroalcohólicos después de la exposición a CCl_4 40mM por 2 horas sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en el consumo de glutatión reducido .

3.6 Obtención de las subfracciones del extracto hidroalcohólico con mayor actividad hepatoprotectora utilizando solventes de diferente polaridad.

El porcentaje de recuperación obtenido para las diferentes subfracciones oscilo entre 7.89 a 11.36 (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de recuperación obtenido para las diferentes subfracciones.

		Fracción	% Recuperación
Extracto de Flor de <i>Centaurea</i> <i>americana</i>	1	n-hexano	10.25 %
	2	Acetato de etilo	11.36 %
	3	n-butanol	9.64 %
	4	Residuo acuoso	7.89 %

3.7 Evaluación de la actividad antioxidante y hepatoprotectora de las subfracciones en la línea celular de hepatoma Huh7 expuestos a CCl₄.

3.7.1 Efecto de las subfracciones del extracto de flor de *Centaurea americana* sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en la evaluación de los niveles de AST.

Se observó que la subfracción de acetato de etilo no produjo daño celular importante por liberación de AST al medio a las concentraciones evaluadas. A concentraciones de 10 y 100 µg/mL el resto de las subfracciones no presentaron daño, sin embargo a la concentración de 1000 µg/mL el daño fue evidente (Figura 21).

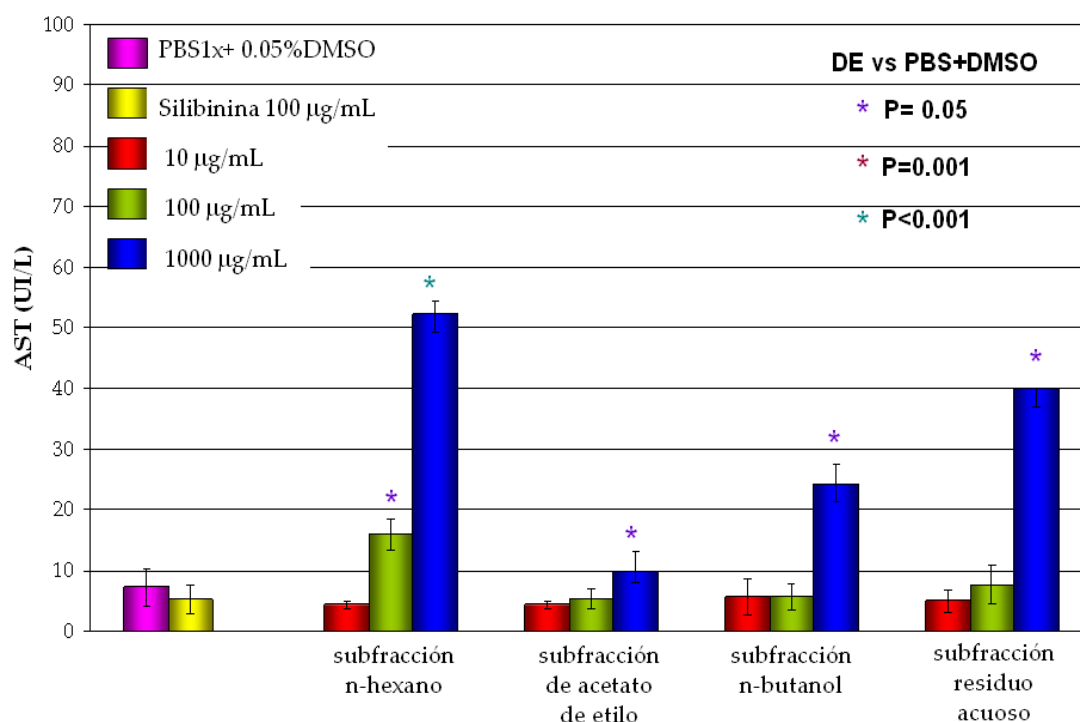


Figura 21. Efecto de las subfracciones del extracto de flor de *Centaurea americana* sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en la evaluación de los niveles de AST.

3.7.2 Efecto de las subfracciones del extracto de flor de *Centaurea americana* sobre la línea celular de hepatoma Huh7, evaluación de la viabilidad celular.

Referente a viabilidad celular, se observó que las subfracciones de acetato de etilo y residuo acuoso a 10 y 100 µg/mL y de n-butanol a 10 µg/mL fue superior a 90%. La subfracción de n-hexano fue la que produjo la mayor disminución de la viabilidad celular en una relación dosis dependiente (Figura 22).

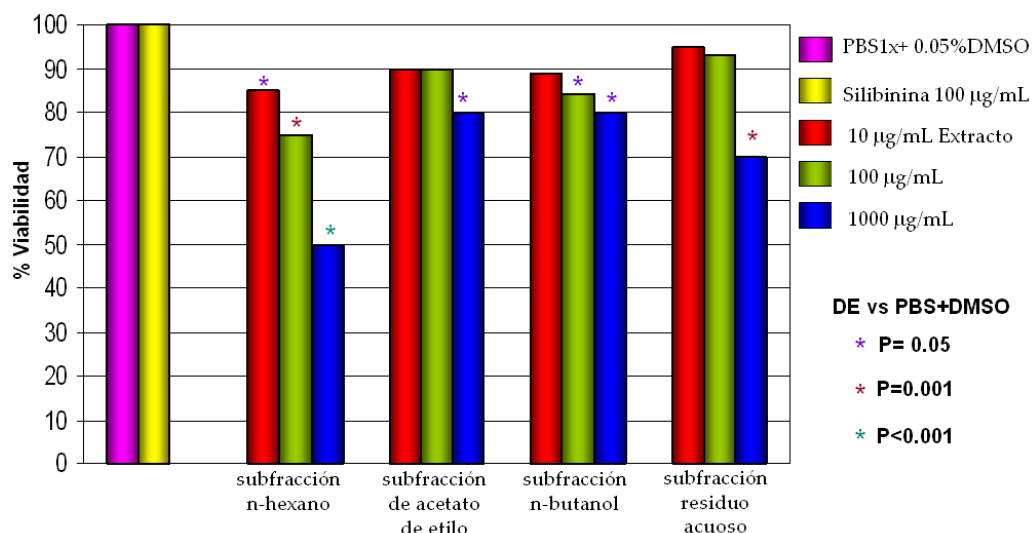


Figura 22. Efecto de las subfracciones del extracto de flor de *Centaurea americana* sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en la evaluación de la viabilidad celular.

3.7.3 Efecto de las subfracciones del extracto de flor de *Centaurea americana* sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en la producción de malondialdehído.

Referente a la producción de MDA por la célula se observó que a la concentración de 10 µg/mL los extractos evaluados fueron similares al control sin tratamiento, excepto para n-hexano que fue similar al control de silibinina. A concentración de 100 µg/mL los extractos fueron similares al control silibinina, excepto para n-hexano. A 1000 µg/mL todos fueron superiores al control sin tratamiento y silibinina ($P < 0.001$) (Figura 23).

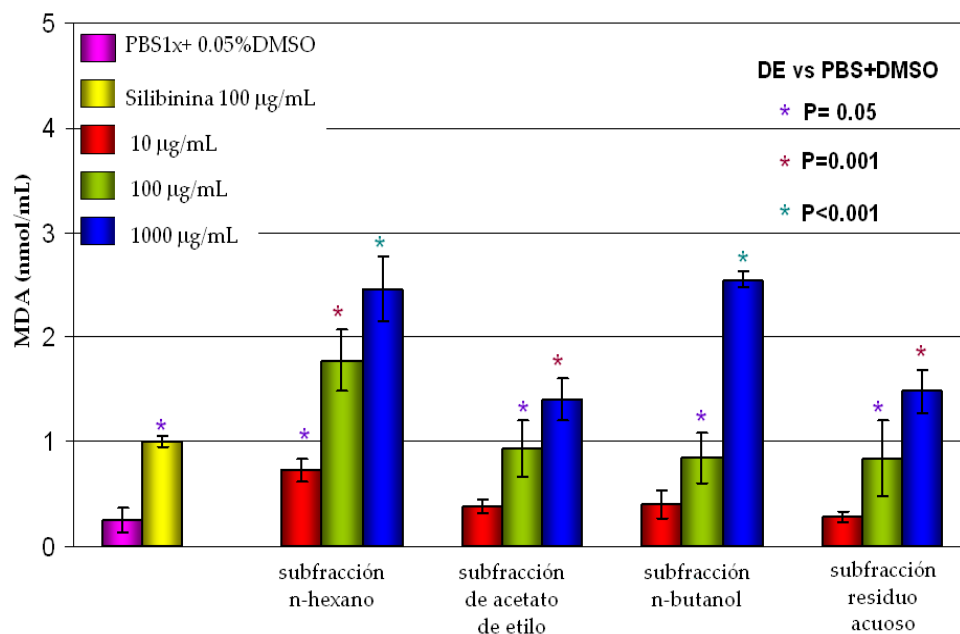


Figura 23. Efecto de las subfracciones del extracto de flor de *Centaurea americana* sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en la producción de malondialdehído.

3.7.4 Efecto hepatoprotector de las subfracciones del extracto de flor de *Centaurea americana* sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en los niveles de AST.

Se observó a través de la liberación de AST (UI/L) que la subfracción de acetato de etilo mostró una actividad hepatoprotectora a concentración de 100 y 1000 µg/mL. Las concentraciones evaluadas de los extractos de n-hexano y residuo acuoso no mostraron efecto hepatoprotector. El extracto n-butanol mostró hepatoprotección a dosis de 10 y 100 µg/mL (Figura 24).

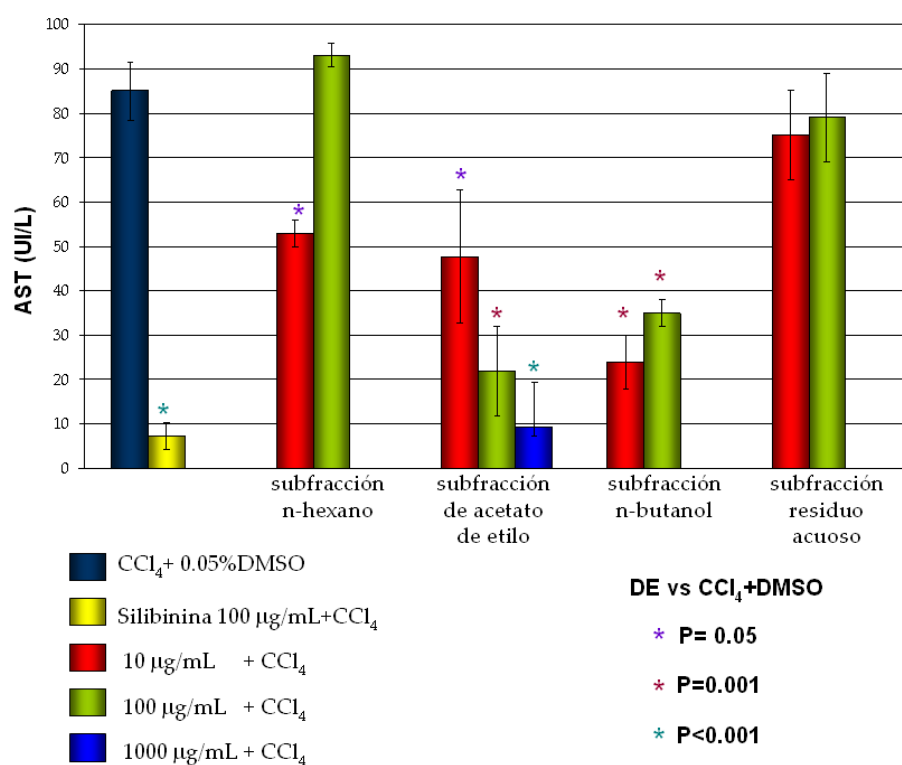


Figura 24. Efecto de las subfracciones del extracto de flor de *Centaurea americana* después de la exposición a CCl₄ 40mM por 2 horas sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en los niveles de AST.

3.7.5 Efecto hepatoprotector de las subfracciones de flor de *Centaurea americana* sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en la producción de malondialdehído.

El tratamiento de las células con las subfracciones de acetato de etilo (100 y 1000 µg/mL) y n-hexano (10 µg/mL) previnieron la lipoperoxidación, cuando estas células se expusieron a CCl₄ (Figura 25).

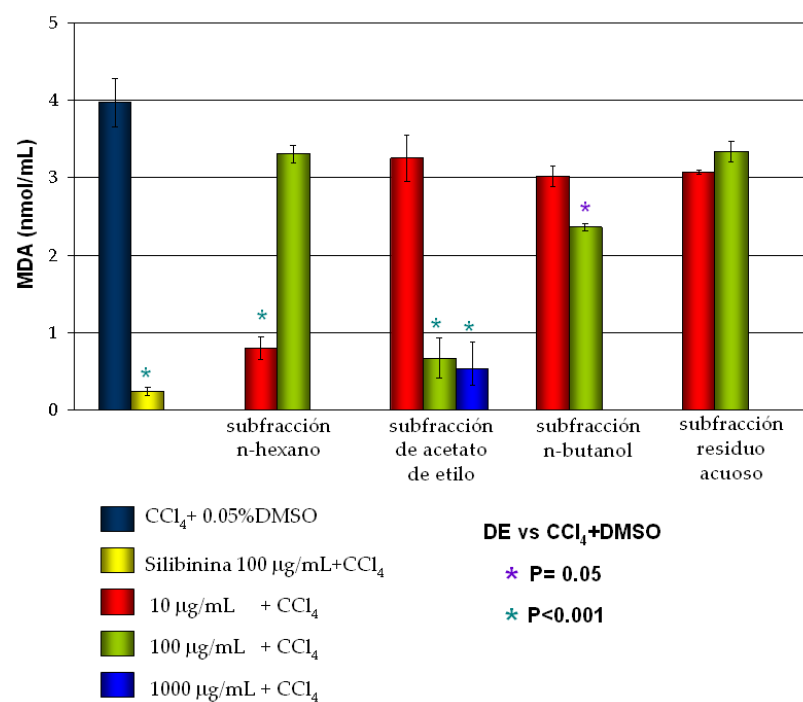


Figura 25. Efecto de las subfracciones de flor de *Centaurea americana* después de la exposición a CCl₄ 40 mM por 2 horas sobre la línea celular de hepatoma Huh7 en la producción de malondialdehído.

Discusión

En el presente trabajo se eligieron plantas del noreste del país ya que los estudios de plantas con actividad antioxidante reportados en la literatura son referidos a plantas del centro y sur, y hasta la fecha solo se ha reportado el efecto hepatoprotector de un extracto de cinco plantas de la región occidente de nuestro país (Miranda *et.al.*, 2005).

La selección de las plantas se llevó a cabo bajo criterios etnofarmacológicos y quimiotaxonómicos con la ayuda del Biólogo Humberto Sánchez quien orientó sobre la localización y la relación taxonómica con otras plantas reportadas con actividad antioxidante. Las plantas seleccionadas bajo estos criterios fueron *Centaurea americana*, *Juglans mollis*, *Krameria ramosissima* y *Turnera diffusa*.

Se ha reportado por diversos autores el uso de etanol como sistema extractante para demostrar la capacidad hepatoprotectora de extractos de plantas. En este trabajo se utilizó una mezcla de etanol-agua como sistema de extracción, ya que con este se logró obtener un rango más amplio de polaridades de los compuestos a extraer (Orozco, 2004). El porcentaje de recuperación más alto y bajo que se obtuvo utilizando este solvente fue para a la flor-tallo y raíz de *Turnera diffusa* (damiana) de 9.58 y 1.43 respectivamente.

Estudios fitoquímicos previos han atribuido la actividad hepatoprotectora de diversas plantas a su capacidad antioxidante (Sureshkumar *et al.*, 2006; Sadasivan *et al.*, 2006; Sultana *et al.*, 1995; Shanmugasundaram *et al.*, 2006; Ying-Shan *et al.*, 2005; Germano *et al.*, 2005; Ljubuncic *et al.*, 2006; Manna *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2006; Shyamal *et al.*, 2006; Jamshidzaeh *et*

al., 2005; Lee *et al.*, 2005). En el presente trabajo se demostró el efecto antioxidante y hepatoprotector de las cuatro plantas seleccionadas a través del daño inducido por CCl₄ en un modelo de toxicidad *in vitro* sobre la línea celular de hepatoma Huh7. La evaluación de la capacidad antioxidante puede realizarse a través de métodos químicos y biológicos. Entre los métodos químicos el secuestro de radicales libres con DPPH es uno de los más utilizados (Russo *et al.*, 2005, Garnica *et. al.*, 2006; Ljubuncic *et al.*, 2006). Las cuatro plantas evaluadas *Centaurea americana*, *Turnera diffusa*, *Krameria ramosissima* y *Juglans mollis* demostraron tener una capacidad antioxidante a través del análisis de reducción de DPPH oscilando ésta entre un 53 hasta un 82%. Por otro lado, se evaluó la capacidad antioxidante a través de dos métodos biológicos (MDA y glutatión). En el primero la peroxidación lipídica inducida por el estrés oxidativo fue determinada por la cuantificación de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico, expresándose este resultado como equivalentes de MDA (Ljubuncic *et. al.*, 2006). La valoración de la actividad antioxidante a través de los equivalentes de MDA se desarrolló en dos etapas. La primera etapa se contempló por la exposición a los extractos sobre la línea celular Huh7 y la segunda etapa por la exposición posterior al extracto del CCl₄ sobre la línea celular.

Como se pudo observar en la primer etapa del estudio, la concentración de MDA en la mayoría de los extractos analizados a una dosis de 10 µg/mL no presentaron diferencia estadística vs el control negativo, además de estar sus valores de MDA muy por debajo del control positivo de silibinina.

Estos hallazgos sugieren que la mayoría de los extractos no inducen daño, con excepción de *Turnera diffusa* y corteza de *Juglans mollis*. Se observó

también que la concentración de MDA en el resto de los extractos a las dosis de 100 y 1000 µg/mL fue dosis dependiente y en la mayoría de los extractos a concentración de 1000 µg/mL se demostró más liberación de MDA. Estos resultados correlacionaron con la liberación de AST y viabilidad indicando daño de los extractos sobre la línea celular Huh7.

Por otro lado, se evaluó la actividad hepatoprotectora utilizando MDA, las células incubadas con los extractos fueron retadas con CCl₄. La concentración de MDA con la mayoría de los extractos evaluados se observó como una disminución con respecto al control de toxicidad con CCl₄ con excepción de la hoja de *Juglans mollis*. Estos hallazgos sugieren una capacidad antioxidante de los extractos evaluados de manera dosis dependiente. Cabe resaltar que las hojas de *Juglans mollis* no mostraron actividad antioxidante a la concentración de 10 µg/mL, superando los valores de MDA del control de toxicidad con CCl₄. Es notorio también que la flor de *Centaurea americana* y la fruto de *Juglans mollis* a las dosis de 10 y 100 µg/mL mostraron una capacidad antioxidante muy semejante al control de silibinina.

Se ha descrito una disminución de los niveles de glutatión en aquellos extractos que inducen un incremento de la peroxidación de lípidos, por lo que esto sirve para medir indirectamente la capacidad antioxidante (Ljubuncic *et al.*, 2006). En este estudio se observó que el extracto de la flor de *Centaurea americana* a todas las dosis analizadas, así como los extractos de *Turnera diffusa*, fruto y hoja de *Juglans mollis* a las concentraciones de 10 µg/mL no mostraron disminución de los niveles de glutatión, sin embargo, el resto de los extractos de las plantas analizadas a

las diversas concentraciones disminuyeron los niveles de glutatión sugiriendo un incremento de la peroxidación lipídica en la línea celular Huh7. Por otro lado, se observó que al retar la línea celular con CCl₄ los niveles de glutatión disminuyeron en presencia de los extractos y a todas las dosis evaluadas aún más que el control positivo de toxicidad, sin embargo la silibinina no indujo reducción de glutatión en este mismo ensayo.

Si bien se ha reportado que diversos extractos de plantas pueden tener un efecto hepatotóxico (Stickel *et al.*, 2005), los extractos hidroalcohólicos de las cuatro plantas mostraron tener un efecto tóxico sobre la línea celular Huh7 solo a la dosis de 1000 µg/mL, con excepción del extracto de *Centaurea americana* que no mostró toxicidad a las dosis analizadas (10,100,1000 µg/mL). Estos resultados permitieron establecer el efecto hepatoprotector a las dosis de los extractos que no fueron tóxicos para la línea celular Huh7, corroborándose este efecto con el ensayo de viabilidad a través de la prueba de MTT; en este caso se observó una correlación inversa entre la liberación de AST con el % de viabilidad, es decir, aquellos extractos que no mostraran toxicidad (de acuerdo a la poca liberación de la enzima AST) produjeron porcentajes de viabilidad superiores al 80%.

El estudio de la actividad hepatoprotectora de extractos de plantas principalmente se ha realizado a través de modelos *in vivo*, utilizando el daño hepatotóxico en ratas inducido por diversos agentes tales como CCl₄, acetoaminofén y n-acetilgalactosamina (Shyamal *et al.*, 2006). Recientemente se han empleado los modelos *in vitro* para evaluar la actividad hepatoprotectora de diversos compuestos o extractos de plantas

(Tchounwou *et al.*, 2001; Russo *et al.*, 2005; Garnica *et al.*, 2006). En el presente trabajo se reporta por primera vez la utilización de un modelo *in vitro* de daño por CCl₄ sobre la línea celular de hepatoma Huh7. Se establecieron las condiciones para evaluar la actividad tóxica y hepatoprotectora de los extractos de las plantas analizadas (dosis de 40 mM de CCl₄ por 2 horas).

Como se ha descrito, el CCl₄ es biotransformado por la citocromo P-450 en el retículo endoplásmico del hígado al radical libre triclorometilo, que es altamente reactivo. Este radical libre reacciona con el oxígeno para formar el radical triclorometilperoxilo, el cual ataca los lípidos de la membrana del retículo endoplásmico más rápido que el radical libre triclorometilo. El radical triclorometilperoxilo causa una serie de cambios celulares entre los cuales se encuentra la elevación de enzimas y finalmente resulta en muerte celular (Clawson, 1989). Se estableció que de las dos enzimas hepáticas evaluadas, solamente la AST permitió observar claramente la inducción de daño dosis-dependiente del CCl₄ sobre las células; por este motivo se utilizó solo esta enzima en el resto del diseño experimental. Cabe mencionar que solo se reportó la actividad hepatoprotectora de aquellos extractos que no indicaron toxicidad previa sobre la línea celular Huh7 o aquellos extractos que mostraron una potencial actividad antioxidante, por lo que se excluyó la planta *Krameria ramosissima*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que los extractos hidroalcohólicos de las diversas partes de las tres plantas restantes analizadas exhibieron un efecto hepatoprotector de una manera dosis

dependiente, evidenciado por la disminución de los niveles de la AST así como por la disminución del MDA. En base a estos hallazgos se sugiere que el efecto hepatoprotector en este modelo *in vitro* sea evaluado a través AST y MDA, ya que estos dos ensayos mostraron correlación estadísticamente positiva en la mayoría de los extractos.

De acuerdo a los resultados obtenidos tanto de toxicidad (a través de AST y viabilidad), actividad antioxidante (a través de MDA y glutatión) y actividad hepatoprotectora (a través de AST) se estableció que el extracto de la flor de *Centaurea americana* fue el que mostró mayor potencial de estudio para la siguiente fase de este trabajo. Los solventes empleados para obtener las subfracciones fueron n-hexano, acetato de etilo, n-butanol y el residuo acuoso. Los porcentajes de recuperación en cada uno de ellos fueron 10.25, 11.36, 9.64 y 7.89 respectivamente.

Al evaluar la toxicidad de las subfracciones se determinó que la mayoría de éstas no fueron tóxicas a las dosis de 10 y 100 µg/mL a excepción de la de n-hexano, la cual mostró toxicidad a las dosis de 100 y 1000 µg/mL. Cabe resaltar que todas las subfracciones a dosis de 1000 µg/mL mostraron un efecto tóxico por la liberación de AST, correlacionado esto con el porcentaje de viabilidad.

Por otro lado, al evaluar la capacidad antioxidante a través del MDA se observó una respuesta dosis dependiente. La mayoría de las subfracciones mostraron una baja liberación de MDA a excepción de n-hexano a dosis de 10 µg/mL. Sin embargo, a dosis de 100 µg/mL mostraron niveles de MDA

más bajos que la silibinina sugiriendo su potencial acción antioxidante a las dosis de 10 y 100 µg/mL.

Con respecto a la actividad hepatoprotectora de las subfracciones seleccionadas evaluadas a través de la liberación de AST se determinó que la subfracción de acetato de etilo a dosis de 1000 µg/mL mostró tener un efecto hepatoprotector semejante a la silibinina. Esta subfracción a dosis de 100 µg/mL presentó una disminución de la liberación de AST con respecto al control de toxicidad con CCl₄, sin embargo fue mayor que la producida por la silibinina. Se sugiere que esta subfracción es la que contiene la mayoría de los compuestos con potencial efecto hepatoprotector.

Al evaluar la actividad antioxidante de las subfracciones a través del MDA en la línea celular retada con CCl₄, se determinó que todas las subfracciones de acetato de etilo a 100 y 1000 µg/mL mostraron un fuerte potencial antioxidante al compararse contra el control de toxicidad, mostrando además valores muy cercanos de liberación de MDA que la silibinina. Estos hallazgos sugieren que esta subfracción tiene un fuerte potencial antioxidante.

Con los resultados del presente trabajo se estableció que la subfracción de acetato de etilo de la flor de *Centaurea americana* es la de mayor potencial para realizar el aislamiento biodirigido de compuestos con actividad hepatoprotectora.

La *Centaurea americana* pertenece a la familia Asteraceae a la cual pertenece el *Silybum marianum*. De esta última planta se han aislado

diversos compuestos con actividad hepatoprotectora (Ball *et al.*, 2005; Lieber *et al.*, 2003) y hasta la fecha es uno de los productos herbarios más empleados para el tratamiento de las enfermedades hepáticas.

Se ha descrito el aislamiento de sesquiterpenolactonas, dibencilbutirolactonas, lignanos y fitoecdisteroides de *Centaurea americana* atribuyéndoles a estos su actividad antioxidante (Karamenderes *et al.*, 2006; Güven *et al.*, 2005; Arif *et al.*, 2004; Kumarasamy *et al.*, 2003; Panagouleas *et al.*, 2003; Garbacki *et al.*, 1999; Heinrich *et al.*, 1998). Como se demostró la *Centaurea americana* fue la planta que presentó mayor capacidad hepatoprotectora por lo que se sugiere que esta actividad pudiera deberse a su capacidad antioxidante.

CAPITULO V

Conclusiones

- Todas las plantas presentaron actividad antioxidante por DPPH, variando de acuerdo a la parte de la planta utilizada.
- Se estableció por primera vez el uso de un modelo *in vitro* de daño por CCl₄ sobre la línea celular de hepatoma humano Huh7 para la evaluación de la actividad hepatoprotectora de extractos de plantas.
- El extracto hidroalcohólico de flor de *Centaurea americana* fue el único que no mostró efecto tóxico sobre la línea celular Huh7 a las dosis de estudio a través de los ensayos realizados.
- El extracto hidroalcohólico de flor de *Centaurea americana* mostró actividad hepatoprotectora a las concentraciones evaluadas.
- La subfracción de acetato de etilo de la flor de *Centaurea americana* no mostró efecto tóxico sobre Huh7 y presentó actividad hepatoprotectora a las dosis de 100 y 1000 µg/mL.
- La actividad hepatoprotectora puede ser debida a presencia de moléculas antioxidantes en el extracto.

CAPITULO VI

Perspectivas

- Purificación y aislamiento biodirigido de los compuestos de interés de *Centaurea americana*.
- Evaluar la actividad hepatoprotectora del o los compuestos activos en un modelo *in vitro* e *in vivo*.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad A, Pillai KK, Najmi AK, Ahmad SJ, Pal SN, Balani DK. Evaluation of hepatoprotective potential of jigrine post-treatment against thioacetamide induced hepatic damage. J of Ethnopharmacol 2002;79(1):35-41.
- Angulo P. Use of ursodeoxycholic acid in patients with liver disease. Curr Gastroenterol Rep, 2002;4(1):37-44.
- Ansorena E, García ER, Martínez ML, Huang ZZ, Chen L, Mato JM, Avila MA. S-adenosylmethonine and methythioadenosine are antiapoptotic in cultured rat hepatocytes but proapoptotic in human hepatoma cells. Hepatol, 2002; 35(2): 274-80.
- Argueta A. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 1994.
- Arif R, Küpeli E y Ergun F. The biological activity of *Centaurea* L. species, G.U. J Sci, 2004; 17(4) : 149-164.
- Ball K.R. and Kowdley K. A review of *Silybum marianum* (Milk Thistle) as a treatment for alcoholic liver disease. J Clin Gastroenterol, 2005; 39(6): 520-528.
- Bataller R and Brenner D.A., Liver Fibrosis. J of Clin Invest, 2005; 209-218.
- Bellentani S, Immunomodulating and anti-apoptotic action of ursodeoxycholic acid: where are we and where should we go?. Europ J of Gastroenterol and Hepatol, 2005; 17(2): 137-140.

- Bergmeyer HU, Horder M. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase. J Clin Chem Clin Biochem, 1980; 18: 521-534.
- Blumenthal M, Herbal Medicine: Expanded Commission E monographs 2000.
- Boigk G, Stroedter L, Herbst H, Waldschmidt J, Riecken E.O., Schuppan D. Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. Hepatol 1997; 26: 643-649.
- Bone-Larson CL, Hogaboam CM, Evanhoff H, Strieter RM and Kunkel SL. IFN- gamma inducible protein 10 (CXCL10) is hepatoprotective during acute liver injury through the induction of CXCR2 on hepatocytes. J of Immunol, 2001; 167: 7077-7083.
- Cabrera L.G., Tratado de Plantas Curativas de México, Plantas Medicinales, Damiana (*Turnera aphrodisiaca*). Pág 79-81.
- Carrie B. and Brownson K. The growing acceptance of complementary and alternative medicine. Health Care Manager 2002; 20(3): 11-21.
- Casas S, Viveros JL, Caballero J. Etnobotánica mixteca, sociedad, cultura y recursos naturales en la montaña de Guerrero. INI-CONACULTA. 1994; 366
- Castañeda S.R. y Muñoz E.L.E. Hepatitis víricas agudas. Hepatología desde la Biología Molecular al diagnóstico, tratamiento y prevención. Ed Mc Graw Hill, 2007: Cap 6, 75-89.
- Chang C.Y., Argo C.K., Al-Osaimi A.M. and Caldwell S.H. Antioxidants and Cytoprotective agents. J Clin Gastroenterol 2006; 40(1): S51-S60.

- Chavez M.L. Treatment of hepatitis C with milk thistle? J Herb Pharmacother 2001; 1(3): 79-90.
- Chrungoo V.J., Singh K., Singh J. Silymarin mediated differential modulation of toxicity induced by tetrachloride, paracetamol, and D-galactosamine in freshly isolated rat hepatocytes. Indian J Exp Biol 1997; 35: 611-617.
- Clawson GA. Mechanism of carbon tetrachloride hepatotoxicity, Pathol and Immunopathol Res 1989; 8: 104–112.
- Coffin C.S. and Lee S.S. Chronic Hepatitis B-Who should be treated?. Med Gen Med 2006; 8(1): 75-80.
- Cohen, MH. Complementary and integrative medical therapies, the FDA, and the NIH: definitions and regulation. Derm Ther 2003;16 (2) :77-84.
- Comar K.M. and Kirgy D.F. Herbal remedies in Gastroenterology. J Clin Gastroenterol 2005; 39(6): 457-468.
- Conjeevaram H.S., Lok A.S. Management of chronic hepatitis B., J of Hepatol 2003; 38 (6): S90-S103.
- Dajir F, Guevara L, Arosamena L, Suárez GI y Kersenobich D. Consideraciones sobre la epidemiología de la cirrosis hepática alcohólica en México. Rev Invest Clin Mex 1978;30:13-28.
- De Smet PA. Herbal remedies. N Engl J Med. 2002; 347(25):2046-56.
- Dean M.R., Scott L.J. y Plosker G.L. Entecavir. Revisión de su utilización en la hepatitis B crónica. Drugs 2006; 66(12): 1605-1622.

- Dehmlow C, Erhard J, de Groot H. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology* 1996; 23(4): 749-754.
- Di Bisceglie A.M., Catithers R.L and Gores G.J., Hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003; 28(4): 1161-1165.
- Domínguez L, Hepatotoxicity of herbal remedies. *J Hepatol*. 1997; 26 Suppl 1:47-51.
- Domínguez L. Hepatotoxicity of herbal remedies and mushrooms. *Semin Liver Dis*. 1995; 15(3):183-8.
- Erdemoglu N, Küpeli E and Yesilada E. Anti-inflammatory and anticonceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. *J of Ethnopharmacol* 2003; 89(1): 123-129.
- Farnsworth N.R. and Fabricant D.S. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery, *Environmental Health Perspectives*, 1991; 109 (S1):69-75.
- Ferenci P, Formann E, Laferl H, Gschwantler M, Hackl F, Brunner H, *et al*. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of peginterferon alfa-2a (40 KD) plus ribavirin with or without amantadine in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C genotype 1 infection. *J of Hepatology* 2006; 44: 275-282.
- Fernández-Checa J.C., Kaplowitz N., García-Ruíz C., Colell A. Mitochondrial glutathione: importance and transport. *Semin Liver Dis*. 1998;18(4):389-40.
- Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 139-143.

- Flora K., Hahn M., Rosen H., Benner K. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *Am J Gastroenterol.* 1998 ;93(2):139-43.
- Fogden E and Neuberger J. Alternative medicine and the liver. *Liver International* 2003; 23: 213-220.
- Fogden E, Neuberger J. Alternative medicines and the liver. *Liver Int.* 2003; 23(4):213-20.
- Fried M.W., Shiffman M.L., Reddy K.R., Smith C. , Marinos G., Gonçalves F.L., et.al. Peginterferon Alfa-2a plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection. *N Engl J of Med* 2002; 347(13):975-982.
- Galambos JT and Riepe SP. Cirrhosis. En *Current Hepatology* Gitnick GL, Ed USA: Wiley Medical, 1983:Vol. 3, 103-105.
- Garbacki N, Gloaguen V, Damas J, Bodart P, Tits M, Angenot L. Anti-inflammatory and immunological effects of *Centaurea cyanus* flower-heads. *J Ethnopharmacol* 1999; 68 (1-3):235-241.
- Germano M.P., Angelo V.D., Sanogo R., Catania S., Alma R., De Pasquale R. Hepatoprotective and antibacterial effects of extracts from *Trichilia emetica* Vahl. (Meliaceae). *J of Ethnopharmacol* 2005; 96: 227-232.
- Giese L.A. Complementary healthcare practices. *Gastroenterol Nurs* 2001; 24:38-40.
- Grant BF, Dufour MC and Harford TC. Epidemiology of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1988; 8(1):12-25.

- Gutiérrez D.M. y Betancourt A.Y. El mercado de plantas medicinales en México, situación actual y perspectivas de desarrollo. RICOPLAM-RIPROFITO 2006; 1-7.
- Güven K, Çelik S and Uysal I. Antimicrobial activity of *Centaurea* species. Pharm Biol, 2005; 43(1): 67-71.
- Hamburger M, Hostettman K. Bioactivity in plants: the link between Phytochemistry and Medicine. Pytochem, 1991; 30:3864.
- Han K-H, Hashimoto N., Shimada K-I., Sekikawa M, Noda T., Yamauchi H, *et al.* Hepatoprotective effects of purple potato extract against D-galactosamine-induced liver injury in rats. Biosci. Biotechnol. Biochem 2006; 70(6): 1432-1437.
- Heinrich M, Robles M, West J.E., Ortiz M.B., Rodriguez E. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). Annual Rev of Pharm and Toxicol ,1998; 38(1) : 539-565.
- Hernández MR, Díaz MM, Suárez CJA, Trejo SC, López V, Sánchez SI, De Sánchez VC. Adenosine reverse a preestablished CCl₄ induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. Hepatol, 2001;34(4 Pt 1):677-87.
- <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/resource/2002>
- <http://www.foximas.com/ky/2185732.html>, Damiana Leaf Powder (*Turnera diffusa*) 1 b: C.
- Jaeschke H, Gores G.J., Cederbaum A.I., Hinson J.A., Pessayre D. and Lemasters J.J. Mechanisms of Hepatotoxicity. J Gastroenterol Hepatol 2000; 65: 166-176.

- Jamshidzadeh A., Fereidooni F., Salehi Z., Niknahad H. Hepatoprotective activity of *Gundelia tourenfortii*. J of Ethnopharmacol 2005; 101: 233-237.
- Karamenderes C, Khan S, Tekwani B.L., Jacob M.R., Khan I.A. Antiprotozoal and antimicrobial activities of *Centaurea* species growing in Turkey. Pharmaceutical Biology, 2006; 44(7): 534 - 539.
- Kershenobich Stalnikowitz D, Bonder Weissbrod A, Liver Fibrosis and inflammation. A review. Annals of hepatol, 2003, 159-163.
- Kikkawa R, Yamamoto T, Fukushima T, Yamada H and Horii I. Investigation of a hepatotoxicity screening system in primary cell cultures- "What biomarkers would need to be addressed to estimate toxicity in conventional and new approaches?" J of Toxicol Sci 2005; 30(1): 61-72.
- Knowles B.B., Howe C.C., and Aden D.P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 1980;209(4455): 497 - 499
- Kumar S and Sharma A. Anti-anxiety activity studies on Homeopathic Formulations of *Turnera aphrodisiaca* ward. eCAM 2005; 2(1): 117-119.
- Kumarasamy Y, Nahar L, Cox P.J., Dinan L.N., Ferguson C.A., Finnie D.A.*et al.* Biological Activity of lignans from the seeds of *Centaurea scabiosa*. Pharma Biol, 2003; 41(3): 203-206.
- Larrey D and Pageaux P. Hepatotoxicity of herbal remedies and Mushrooms. Sem in Liver Dis, 1995;15(3):183-188.

- Lee H-U, Bae E-A, Han N-J, Kim N-J, Kim D-H. Hepatoprotective effect of ginsenoside Rb1 and compound K on tert-butyl hydroperoxide-induced liver injury. *Liver International* 2005; 25: 1069-1073.
- Lee S.E., Jin H.H., Ha J-S., Jeong H-S and Kim J.H. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sci* 2003; 73: 167-179.
- Lee W.M. Hepatitis B virus infection. *N Eng J of Med* 1997; 337(24):1733-1745.
- Lee WM, Drug-Induced Hepatotoxicity, *N Engl J Med* 2003, 474 - 485.
- Lieber C.S., Leo M.A., Cao Q., Ren C., DeCarli L.M. Silymarin retards the progression of alcohol-induced hepatic fibrosis in baboons. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37(4): 336-339.
- Liu CJ, Kao JH. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: epidemiology and pathogenic role of viral factors. *J Chin Med Assoc.* 2007 Apr;70(4):141-5. Abstract
- Ljubuncic P, Azaizeh H, Portnaya I, Cogan U, Said O, Saleh K.A. Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel. *J of Ethnopharmacol* 2005; 99: 43-47.
- Ljubuncic P., Dakwar S., Portnaya I., Cogan U., Azaizeh H. and Bomzon A. Aqueous extracts of *Teucrium polium* possess remarkable antioxidant activity *in vitro*. *ECAM* 2006; 3(3): 329-338.
- Lok A.J., Bruix J., Sherman M., Llovet J.M., Beaugrand M, et.al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of Barcelona-2000 EASL. *J of Hepatol* 2000; 35(2): 421-430

- Lorenz D, Lucker P.W., Mennicke W.H. Pharmacokinetic studies with silymarin in human serum and bile. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1984; 6: 655-661.
- Lozoya L.X. *et al.* La medicina tradicional en México: Experiencia del programa IMSS-Coplamar, México: IMSS, 1988.
- Lozoya X. Fármacos de origen vegetal de ayer y hoy. *Investigación y ciencia*, 1997; 4:10.
- Luna ALM, Roja AM. *Medicina tradicional de México y sus plantas medicinales*. URL: <http://www.tlahui.com/medic/medic18/planlun1.htm>. 2005.
- Luper S. A review of plants used in the treatment of liver disease: Part 1, *Altern Med Rev* 1998; 3(6): 410-421.
- Luper S. A review of plants used in the treatment of liver disease: part two. *Altern Med Rew* 1999; 4(3): 178-188.
- Manna P, Sinha M and Parames C.S. Aqueous extract of *Terminalia arjuna* prevents carbon tetrachloride induced hepatic and renal disorders. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2006; 6:
- Marcus D.M., and Grollman A.P. Botanical Medicines-The need for new regulations. *N England J Med* 2002; 347 (25): 2073-2075
- Mato J.M., Cámara J, Fernández de Paz J, Caballería L, Coll S, Caballero A, *et al.* S-adenosylmethionine in alcoholic liver cirrhosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind, multicenter clinical trial. *J of Hepatol* 1999; 30: 1081-1089.
- Mayer K.E., Myers R.P., Lee S.S. Silymarin treatment of viral hepatitis: a systematic review. *J Viral Hepat* 2005 ;12(6):559-67.

- McCulloch M, Broffman M, Gao J and Colford J. Chinese Herbal Medicine and Interferon in the Treatment of Chronic Hepatitis B: A Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. American J of Public Health 2002; 92(10): 1619-1627.
- McRae C.A., Agarwal K., Mutimer D., Bassendine M. F. Hepatitis associated with Chinese herbs. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2002; 14(5):559-562.
- Mehrotra R, Rawat S, Kulshreshtha D.K, Patnaik G.K, Dhawan B.N. *In vitro* studies on the effect of certain natural products against hepatitis B virus. Indian J Med Res 1990; 92. 133-138.
- Méndez-Sánchez N y Uribe M, Conceptos actuales en hepatología, Capitulo 1, 3-9. Masson Doyma 2003.
- Méndez-Sánchez N, Almeda-Valdés P and Uribe M, Alcoholic liver disease. An update. Annals of Hepatol 2005; 32-42.
- Méndez-Sánchez N, Villa A.R., Chávez-Tapia N.C., Ponciano-Rodríguez G, Almeda-Valdés P, González D, *et al.* Trends in liver disease prevalence in Mexico from 2005 to 2050 through mortality data. Annals of hepatology 2005; 4(1): 52-55.
- Mendoza M.M, Cardoso P.G., Balmaseda R.A., Crispín R.H., Palacios N.M., Vázquez M.M., La *Turnera diffusa* en el desarrollo testicular de cerdos prepúberes. Arch Zootec 2005; 54: 447-452.
- Miliauskas G, Venskutonis P.R. and Van Beek T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. Food Chemistry 2004; 85(2): 231-237.

- Miranda Beltrán M.D.L., Huacuja R.L., López Velásquez A.L., Panderó C.A. Fitoterapia molecular como parte de la medicina alternativa complementaria en las enfermedades del hígado. *Investigación en salud* 2005; 2: 64-70.
- Montes de Oca-Rosas D y Montes de Oca-Fernández. La medicina alternativa y complementaria, una opción institucional. *Rev Sanid Milit Mex* 2005; 59(6): 385-388.
- Morazzoni P, Bombardelli E. *Silybum marianum* (Carduus marianus). *Fitoter* 1995 ; 3-42.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63
- Muñoz EL, Cordero PP y Escobedo VM. Development of a Liver Unit in Latin America. *Annals Hepatol* 2002; 1(2): 80-84.
- Muñoz ELE, Martínez FJ y García CD. Manual de Hepatología: Epidemiología de las enfermedades hepatobiliares. Primera edición, México: Ediciones Cuellar, 1994;1-12.
- Muñoz LE, Aguilar EM and Bosques FJ. Infection by hepatitis A and B in patients with acute and chronic liver disease in the northeast of México. *Hepatol* 1986;6(5):1114.
- Muñoz LE. Panorama actual de las enfermedades hepáticas en Nuevo León. *Rev Gastroenterol Mex* 1988; 53(2):111-118.
- Naik G.H., Priyadarsini K., Satav J., Banavalikar M., Shohoni D., Biyani M., *et al.* Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. *Phychem* 2002; 63: 97-104.

- Neuman M.G., Cameron R.G., Haber J.A., Katz GG, Malkiewicz I.M., Shear N.H. Inducers of cytochrome P450 2E1 enhance metrotrexate-induced-hepatocytotoxicity. Clin Biochem 1999; 32(7): 519-536.
- Neuschwander-Tetri B and Caldwell S.H., Nonalcoholic steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference, Hepatology 2003, 1202-1219.
- NIH Consensus. NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. NIH Consens State Sci Statements 2002; 19 (3): 1-46
- Organización Mundial de la Salud. Datos básicos para las Américas. Septiembre de 1998. <http://www.who.int>.
- Organización Mundial de la Salud.<http://www.who.int/inf-fs/en/fact204.html>.Abril de 2000.
- Orozco Hayek M. Elección de las condiciones más adecuadas para la obtención de extractos de plantas superiores con actividad sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, UANL, 2004.
- Osuna L, Lozoya X. Plantas medicinales usadas por la medicina tradicional para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales. Rev Med Instituto Mexicano del Seguro Social 1989; 27 : 305-312.
- Otani K, Masaaki K, Michiari O, Ting W, Yanchun L, Steven A. Mitochondrial Dysfunction in Hepatitis C. Journal of Clinical Gastroenterology 2005; 39(4): S162-S166.

- Panagouleas C, Skaltsa H, Lazari D, Skaltsounis L and Sokovic M , Antifungal activity of secondary metabolites of *Centaurea raphanina* spp. Mixta, growing wild in Greece. Pharm Biol, 2003; 41(4): 266-270.
- Pil-Ja Seo, Hong-Dae Choi, and Byeng-Wha Son. Total synthesis of norneolignans from *Krameria* species. Arch Pharm Res, 2004; 27(12):1189-1193.
- Piñeiro Carrero V.M. and Piñeiro E.O., Liver, Pediatrics 2004, 1097-1106.
- Romero C.P., Reyes M.H., Herrera A.A., Lozoya L.X., and Tortoriello J. Aceptación de los fitofármacos por médicos y pacientes en clínicas de atención primaria. Rev Med IMSS 2004; 42(2): 125-130.
- Russo A, Cardile V, Lombardo L, Vanella L, Vanella A, Gargarino J.A. Antioxidant activity and antiproliferative action of methanolic extract of Geum quellyon sweet roots in human tumor cell lines. J of Ethnopharmacol 2005; 100 (323-332).
- Sadasivan S, Latha P.G., Sasikumar J.M., Rajashekaran S., Shyamal S, Shine V.J. Hepatoprotective studies on *Hedyotis corymbosa* (L.) Lam. J of Ethnopharmacol 2006: 4116-4112.
- Sakaida I, Matsumara Y., Akiyama S., Ishige A. and Okita K. Herbal medicine Sho-saiko-to (Tj-9) prevents liver fibrosis and enzyme altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient l-amino acid defined diet. J. of Hepatology, 1998; 28:298-306.
- Salazar R, Pozos ME, Cordero P, Pérez J, Salinas MC, and Waksman N. Determination of the Antioxidant Activity of Six Plants from Northeast Mexico. Pharmaceutical Biology. En prensa. Aceptado Enero 2007.

- Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* 2001; 61: 2035-2063.
- Santra A, Das S, Maity A, *et al.* Prevention of carbon tetrachloride-induced hepatic injury in mice by *Picrorhiza kurroa*. *Indian J Gastroenterol* 1998; 17: 6-9.
- Schulze-Bergkamen H, Untergasser A, Dax A, Vogel H, Büchler P, Klar E, *et al.* Primary human hepatocytes- a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection. *J of Hepatol* 2003; 38: 736-744.
- Schuppan D, Jia JD, Brinkhaus B, Hahn E. Herbal products for liver diseases: a therapeutic challenge for the new millenium. *Hepatol*, 1999; 30: 1109-104.
- Secretaria de Salubridad y Asistencia. <http://www.ssa.gob.mx/epide/2001/sem05/cua85.html>.
- Seeff L.B., Lindsay K.L. , Bacon B.R. , Kresina T.F., Hoofnagle J.A. Complementary and alternative medicine in chronic liver disease. *Hepatol* 2001; 34(3):595 – 603.
- Seeff L.B., Lindsay K.L., Bacon B.R., Kresina T.F., Hoofnagle J.H. Complementary and Alternative Medicine in Chronic Liver Disease. *Hepatol* 2001; 34(3):595-603.
- Seff L.B., Lindsay K.L., Bacon B.R., Kresina T.F.and Hoofnagle J.H. Complementary and Alternative Medicine in Chronic Liver Disease. *Hepatol* 2002; 36 : S1-S2.
- Seow T.K., Liang R., Leow C.K. and Chung M. Hepatocellular carcinoma: from beside to proteomics. *Proteomics* 2001; 1: 1249-1263.

- Shanmugasundaram P. and Venkataraman S. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Hygrophila auriculata* (K.Schum) Heine Acanthaceae root extract. J of Ethnopharmacol 2006; 104: 124-128.
- Shekelle G.P., Morton S.C., Suttorp J.M., Buscemi N and Friesen C. Challenges in sytematic reviews of complementary and alternative medicine topics. Annals of Inter Med 2005; 142(12): 1042-1047.
- Sherlok S. Diseases of the Liver and Biliary System Eighth Edition. Great Britain: Blackwell Scientific Publications, 1989:410-423.
- Shoeb M, MacManus S.M., Kumarasamy Y, Jaspars M, Nahar L, Thoo-Lin P.K., *et al.* Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea Americana*. Phytochem, 2006; 67: 2370-2375.
- Shyamal S., Latha P.G., Shine V.J., Suja S.R., Rajasekharan S., Ganga D.T. Hepatoprotective effects of *Pittosporum neelgherrense* Wight&Arn., a popular Indian ethnomedicine. J of Ethnopharmacol 2006: 4175-4180.
- Simanek V, Kren V, Ulrichová J, Vicar J, Cvak L. Silymarin: what is in the name? an appeal for a change of editorial policy. Hepatol 2000; 32 (2): 442-444.
- Simpson B.B., Plant Science: Explaining Floral Diversity
- Soto L.G. En busca de la salud: medicina tradicional pre-hispanica en el siglo XX: 1974-1976. Horizontes, Bragança Paulista 2003; 21: 117-122.
- Sparreboom A, Cox M.C., Acharya M.R. and William D.F. Herbal remedies in the United Status: Potencial Adverse Interactions with anticancer agents. J of Clinc Oncol 2004; 22(12): 2489-2503.

- Stedman C. Herbal Hepatotoxicity. Semin Liver Dis 2002; 22: 195-206.
- Stewart S.F. and Day C.P., The management of alcoholic liver disease, J of Hepatol, 2003, S2- S13.
- Stickel F., Patsenker E., Schuppan D. Herbal hepatotoxicity. J of Hepatol 2005; 43: 901-910.
- Sultana S, Perwais S, Iqbal M, Athar M. Crude extracts of hepatoprotective plants, *Solanum nigrum* and *Cichorium intybus* inhibit free radical-mediated DNA damage. J of Ethnopharmacol 1995; 45: 189-192.
- Sureshkumar S.V. and Mishra S.H. Hepatoprotective effect of extracts from *Pergularia daemia* Forsk. J of Ethnopharmacol 2006; 1-5.
- Tchounwou P.B., Wilson B.A., Ishaque A.B. and Schneider J. Atrazine potentiation of arsenic trioxide-induced cytotoxicity and gene expression in human liver carcinoma cells (HepG₂). Molecular and Cellular Biochemistry 2001; 222: 49-59.
- Tsai SM, Lee KT, Tsai LY. Effects of S-adenosyl-L-methionine on liver damage in experimental obstructive jaundice. Kaohsiung J Med Sci 2001;17(9):455-60.
- Ulrichová J, Simánek V., Vicar J., Cyak L. Silymarin: What is in the name...? An appeal for a change of editorial policy. Hepatol 2000 ;32(2):442-444.
- Varga Z, Czompa A, Kakuk G, Antus S. Inhibition of the superoxide anion release and hydrogen peroxide formation in PMNLs by flavonolignanos. Phytother Res 2001; 15(7): 608-612.

- Wachtel M , Paulson R, Plese C. Creation and Verification of Reference Intervals. *Laboratory Medicine* 1995; 26:593-7.
- Wilasrumee C, Kittur S, Shah G. Immunostimulatory effect of *Silybum marianum* (milk thistle) extract. *Med Sci Monit* 2002; 8(11): 39-43.
- Yamashiki M, Nishimura A, Suzuki H, Sakaguchi S and Kosaka Y. Effects of the Japanese Herbal Medicine “Sho-saiko-to” (TJ-9) on *In Vitro* interleukin-10 production by peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1997; 25(6): 1390-1397.
- Ying-Shan J, Jae-Hoon S, Tae-Heum S, Hae-Ik R, Myeong-Hyeon W. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Morus bombycis* Koidzumi on CCl₄- induced liver damage. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329(3): 991-995.
- Zhan Y, Li D, Wei H, Wang Z, Huang X, Xu Q, Lu H. Emodin on hepatic fibrosis in rats. *Chin Med (Engl)* 2000; 113(7): 599-601.